Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Einfluß von Sulpirid auf den Androgenrezeptor in der ventralen Prostata der Ratte

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ULRICH STEINBACH
aus Ludwigsburg

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543903_0082

Aus der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik
der Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten
Direktor: Professor Dr. D. Gupta, F. R. C. Path.
der Kinderklinik der Universität Tübingen

Einfluß von Sulpirid auf den Androgenrezeptor in der ventralen Prostata der Ratte

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
ULRICH STEINBACH
aus Ludwigsburg

1986

Dekan: Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. H. Moeller
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Harzmann

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Meiner Mutter gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	6
2.1.	Tiere	6
2.2.	Chemikalien	7
2.2.1.	Nicht radioaktive Verbindungen	7
2.2.2.	Radioaktive Verbindung	8
2.3.	Pufferlösungen	9
2.3.1.	Michaelispuffer	9
2.3.2.	Tris-Puffer	9
2.3.3.	DTT-Tris-Puffer	10
2.3.4.	DTT-Sucrose-Tris-Puffer (DST)	10
2.3.5.	NAD-ase-DST-Puffer	10
2.4.	Geräte	11
2.5.	Proteinbestimmung	12
2.6.	DNA-Bestimmung	13
2.7.	Bestimmung des Androgenrezeptors	15
2.7.1.	Homogenisierung und Suspendierung	15
2.7.2.	Ultrazentrifugation	16
2.7.3.	Inkubation	17
2.7.4.	Agargelelektrophorese	17
2.7.5.	Tabellarische und graphische Darstellung der Ergebnisse der Agargelelektrophorese	20
2.8.	Berechnung der Rezeptormenge	22
2.9.	Weitere Methoden	25
2.10.	Statistische Auswertung	25
3.	ERGEBNISSE	27
3.1.	Tabellen der Primär- und abgeleiteten Daten	27
3.2.	Konzentration von Prolaktin im Serum	32
3.3.	Konzentration von Testosteron im Serum	34
3.4.	Konzentration von Testosteron im Pellet	36

Seite

3.5.	Rezeptorkonzentration im Cytosol	38
3.6.	Korrelation der Konzentration von Prolaktin im Serum mit der Rezeptorkonzentration	41
3.7.	Korrelation der Konzentration von Testosteron im Serum mit der Rezeptorkonzentration	41
3.8.	Korrelation der Konzentration von Prolaktin im Serum mit der Konzentration von Testosteron im Pellet	41
4.	DISKUSSION	42
4.1.	Analytische Verfahren	42
4.1.1.	Lagerung und Homogenisierung des Untersuchungsmaterials	42
4.1.2.	Markierung des Rezeptors	43
4.1.3.	Inkubationszeit und -temperatur	44
4.1.4.	Abtrennung des markierten Rezeptors	44
4.1.5.	Supprimierung der spezifischen Bindung	46
4.1.6.	Die Korrekturformel	47
4.1.7.	Proteinbestimmung	48
4.1.8.	DNA-Bestimmung	48
4.2.	Ergebnisse	49
4.2.1.	Prolaktinkonzentration im Serum	49
4.2.2.	Testosteron im Serum	50
4.2.3.	Rezeptorbindungsstellen	50
4.2.4.	Testosteronkonzentration im Pellet	53
5.	ZUSAMMENFASSUNG	55
6.	ABKÜRZUNGEN	57
7.	LITERATURVERZEICHNIS	58

1. EINLEITUNG

Bisher ist nicht bekannt, wie die Konzentration des Androgenrezeptors in den akzessorischen Geschlechtsdrüsen reguliert wird. Einerseits gibt es Hinweise auf eine Induktion des Rezeptors durch zirkulierende Androgene, andere Experimente zeigen jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Bindungskapazität des Androgenrezeptors und den Konzentrationen der Androgene im Serum.

Für eine Regulation durch Androgene spricht, daß der Rezeptorgehalt in der Prostata sinkt, wenn die Testosteronkonzentration im Blut abnimmt, zum Beispiel im Senium der Tiere oder nach Orchidektomie (SULLIVAN und STROTT 1973, BLONDEAU u.a. 1975, BRUCHOVSKY und CRAVEN 1975, BOESEL u.a. 1980). Ferner kann eine Substitution von Testosteron sowohl den Rezeptorabfall nach Orchidektomie verhindern oder rückgängig machen als auch den im Senium der Tiere verminderten Rezeptorgehalt wieder auf die Werte junger, reifer Tiere anheben (SULLIVAN und STROTT 1973, BLONDEAU u.a. 1975, BOESEL u.a. 1980).

Auf androgenunabhängige Regulationsmechanismen weisen jedoch der initiale Anstieg des Androgenrezeptors nach Kastration und der erneute Anstieg des Rezeptors acht Tage nach Orchidektomie hin, der sich auch bei adrenalektomierten oder hypophysektomierten Tieren findet (SULLIVAN und STROTT 1973, BLONDEAU u.a. 1975, BOESEL u.a. 1980).

MOELLER (1982) und LANDER (1983) konnten während der Pubertät der Ratte ebenfalls keinen Zusammenhang zwischen den Konzentrationen der Androgene im Serum und der Rezeptorkonzentration feststellen. Dem Anstieg der Rezeptorkonzentration am 35. Tag ging zwar ein Anstieg der Androgene im Serum voraus, bei den 20 Tage alten Tieren bestand jedoch trotz niedriger Androgenkonzentrationen im Serum eine hohe

Rezeptorkonzentration, und ein zweiter Rezeptorgipfel war bei 55 Tage alten Tieren zu finden, obwohl die Androgenkonzentrationen im Serum bereits konstant waren.

Bei pubertären Tieren ist möglicherweise Melatonin an der Regulation des Androgenrezeptors beteiligt: Kontinuierliche Dunkelheit von 4 Tagen senkte bei 35 Tage alten Ratten die Konzentration des Rezeptors, gleichzeitig war die Melatoninkonzentration im Serum erhöht. Dagegen blieb bei reifen, 70 Tage alten Tieren die Rezeptorkonzentration unbeeinflußt, obwohl die Melatoninkonzentration ebenfalls angestiegen war (MOELLER u.a. 1983a). Auch die Injektion einer wässrigen Lösung von Melatonin am späten Nachmittag über 4 Tage führte zu diesem Ergebnis (MOELLER, persönliche Mitteilung).

STÜTZLE (1983) bestimmte die Prolaktinkonzentrationen im Plasma männlicher Ratten (15 bis 90 Tage alt). Die von ihm gefundenen Werte verliefen parallel zu den von MOELLER (1982) und LANDER (1983) gemessenen Konzentrationen des Androgenrezeptors. Daraus schloß man auf eine mögliche Beteiligung von Prolaktin an der Regulierung der Rezeptorkonzentration.

Dafür spricht auch die bereits länger bekannte andromimetische Wirkung des Prolaktins:

Mehrere Versuche zeigen eine höhere Gewichtszunahme der Prostata, wenn Prolaktin zusätzlich zu Testosteron oder LH gegeben wird. GRAYHACK u.a. (1955) wiesen dies bei kastrierten und hypophysektomierten Ratten durch alleinige Substitution von Testosteron gegenüber Substitution von Testosteron und Prolaktin nach. Das gleiche Ergebnis erzielten SEGALOFF u.a. (1956) und JOHNSON (1974) bei hypophysektomierten Tieren mit LH und Prolaktin. Auch MOGER und GESCHWIND (1973) fanden bei orchidektomierten Ratten

eine weitere Zunahme des Naßgewichts des dorsolateralen Prostatalappens bei zusätzlicher Gabe von Prolaktin gegenüber alleiniger Substitution von Testosteron. Dementsprechen wiesen HOSTETTER und PIACSEK (1977) nach, daß die Gabe von Prolaktinantiserum bei Ratten das Gewicht von Prostata und Samenblase verringert, ohne die Androgen- oder FSH-Konzentration im Serum zu beeinflussen.

Eine Gruppe anderer Experimente zeigt, daß die andromimetische Wirkung des Prolaktins über eine erhöhte ^{3}H-Testosteronaufnahme zustande kommt: Die Aufnahme von ^{3}H-Testosteron in Prostatagewebe ist in vitro gesteigert, wenn dem Inkubationsmedium Schafsprolaktin zugesetzt wird (LLOYD u.a. 1973). Die Zunahme der Bindung von ^{3}H-Testosteron an Mikrosomen aus menschlichem Prostatahypertrophiegewebe geht mit der steigenden Bindung von ^{125}J-HPL einher (FARNSWORTH 1975). Die Aufnahme von ^{3}H-Testosteron in Prostatakarzinom oder -hypertrophiegewebe in vivo war bei Patienten gesteigert, deren Prolaktinkonzentration im Serum durch Behandlung mit Chlorpromazin erhöht worden war (FARNSWORTH u.a. 1981).

Prolaktin ist ein Proteohormon, das aus 198 Aminosäuren aufgebaut ist und phylogenetisch dem Wachstumshormon nahesteht. Allgemein ist bekannt, daß es beim Menschen neben anderen Faktoren für die Auslösung und Unterhaltung der Laktation verantwortlich ist und die Wirkungen von LH bezüglich der Reifung des Corpus luteum und der Sekretion von Progesteron verstärkt (WELLHÖNER 1982). Prolaktin wird im Hypophysenvorderlappen gebildet, wobei die prolaktinsezernierenden Zellen unter einem regulierenden Einfluß übergeordneter Zentren stehen. In letzter Stufe beruht dieser regulierende Einfluß auf einem dopaminergen Mechanismus, dessen Hemmung die Prolaktinsekretion steigert, und dessen Stimulation die Prolaktinsekretion vermindert (FLÜCKIGER 1977). So können bestimmte Neurolepti-

ka, wie zum Beispiel Sulpirid, durch Blockade hypothalamischer Dopaminrezeptoren zu einer Freisetzung von Prolaktin führen und dessen Konzentration im Serum erhöhen (CLEMENS u.a. 1974).

Weitere Arbeiten wiesen auf eine Beteiligung von Prolaktin an der Regulierung des Androgenrezeptors hin:

MOELLER u.a. (1985) behandelten 63 Tage alte, orchidektomierte Ratten mit Cyproteronazetat und stellten dabei einen signifikanten Anstieg des Androgenrezeptors im Cytosol fest. Im Zellkern selbst konnten sie keine Rezeptormoleküle nachweisen. Auf Grund dieser Ergebnisse nahm man an, daß Cyproteronazetat die Synthese des Androgenrezeptors induziert, und zwar unabhängig von der Translokation des Rezeptors in den Kern. Dabei war die Testosteronkonzentration im Serum unbeeinflußt geblieben, die Konzentration von Prolaktin war jedoch signifikant erhöht.

Die einwöchige Behandlung 63 Tage alter Ratten mit Lisurid führte dagegen zu einer Abnahme der Konzentration des Androgenrezeptors im Cytosol (MOELLER u.a. 1985, SCHNEIDER, Dissertation Tübingen, in Vorbereitung). Bei unveränderter Testosteronkonzentration im Serum war hier die Konzentration des Prolaktins signifikant erniedrigt.

In den beiden zuletzt referierten Arbeiten bestand außerdem eine Korrelation von Prolaktin- und Rezeptorkonzentration. Diese Ergebnisse ließen vermuten, Prolaktin sei der vermittelnde Faktor der Cyproteronazetat- und Lisuridwirkung. Sie führten, gestützt auf die Befunde über die andromimetische Wirkung des Prolaktins zu der Arbeitshypothese, Prolaktin reguliere den cytoplasmatischen Androgenrezeptor in der ventralen Prostata der Ratte unabhängig von der Translokation des Rezeptors in den Zellkern.

Zur Überprüfung dieser Hypothese sollte in der vorliegen-

den Arbeit untersucht werden, ob eine akute Erhöhung der Prolaktinkonzentration im Serum eine Steigerung der Androgenrezeptorkonzentration im Cytosol der ventralen Prostata der Ratte bewirkt. Dabei sollte die Prolaktinkonzentration durch eine einmalige intraperitoneale Injektion von Sulpirid erhöht werden. Zwei bzw. fünf Stunden nach der Injektion wurden die Konzentrationen des Androgenrezeptors in der Prostata sowie des Prolaktins und Testosterons im Serum bestimmt.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Tiere

Die Tiere stammten von der Tierzucht Ivanovas, Kissleg/ Allgäu. Es handelte sich um männliche Auszuchtratten des Stammes Wistar. Die Tiere waren bei Versuchseintritt 70 Tage alt.

Die Tiere wurden eine Woche vor Versuchsbeginn angeliefert und in einem klimatisierten Raum bei Trockenfutter (Altromin) und Wasser ad libitum gehalten. Der Raum war von 6 Uhr bis 18 Uhr beleuchtet und nachts dunkel.

Die 40 Tiere wurden in 4 Gruppen zu je zehn Tieren randomisiert (Gruppen A - D).

Zwischen 10.00 Uhr und 11.00 Uhr wurde jedem Tier der Gruppe B Sulpirid (Dogmatil^{R}, 25 mg/kg KG) und jedem Tier der Gruppe A das einer Sulpirid-Injektion entsprechende Volumen einer 0,9 %igen Kochsalzlösung intraperitoneal injiziert. Gespritzt wurde dabei in Abständen von drei Minuten abwechselnd ein Tier der Gruppe B und ein Tier der Gruppe A.

Im Anschluß daran wurden zwischen 11.00 Uhr und 12.00 Uhr die Tiere der Gruppen D und C entsprechend behandelt (Gruppe D: Sulpirid, Gruppe C: NaCl).

Genau 2 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere der Gruppen B (Sulpiridgruppe 2 h) und A (Kontrollgruppe 2 h) durch Dekapitation getötet. Die Tiere der Gruppen D (Sulpiridgruppe 5 h) und C (Kontrollgruppe 5 h) wurden 5 Stunden nach Injektion ebenfalls durch Dekapitation getötet.

Bei der Dekapitation wurde das Blut von jedem Tier aufge-

fangen und anschließend 10 Minuten bei 5000 g zentrifugiert. Das gewonnene Serum wurde abpipettiert und bis zur Bestimmung der Konzentrationen von Testosteron und Prolaktin (2.9.) bei -20 °C eingefroren.

Bei den getöteten Tieren wurde das Abdomen eröffnet, der ventrale Prostatalappen von Bindegewebe und Fett freipräpariert und extirpiert. Das entnommene Gewebe wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Gefrierschrank bei -70 °C gelagert.

2.2. Chemikalien

2.2.1. Nicht radioaktive Verbindungen

Die zu den Versuchen verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad "pro analysi" und stammten, soweit nicht anderst angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg) und Sigma (München).

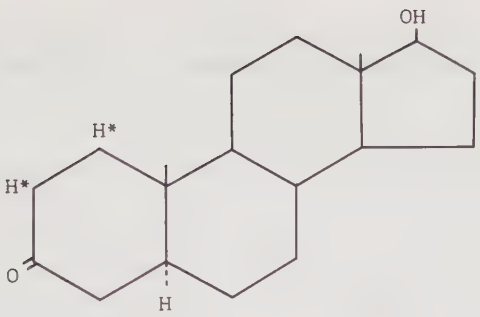
Im einzelnen wurde verwendet:

- Acetaldehyd zur Synthese; Fa. Merck-Schuchardt
- Agar purum; Fa. Behring, Marburg
- Agarose L; Fa. Behring, Marburg
- Ameisensäure 98% - 100%
- Amidoschwarz 10 B
- Desoxyribose (2-Desoxy-D-ribose)
- Diäthyläther
- 5,5-Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz, Puffersubstanz-Barbital-Natrium
- Diphenylamin; Fa. Riedel-de Häen AG, Seelze-Hannover
- DL-Dithiothreitol (DTE, 2,3-Dihydroxyl-1,4-dithiolbutan, Cleland's Reagenz, DTT); Reinheitsgrad Sigma Grade; Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, USA

- Essigsäure 100% (Dichte etwa 1,05)
- 1-O-α-Glucopyranosyl-ß-D-fructo-furanosid (Saccharose); Reinheitsgrad Grade I; Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
- Kochsalz 0,9%; Fa. Fresenius, Bad Homburg
- Methanol
- NAD-ase (NAD^+-Nucleosidase, E.C. 3.2.2.5.); Rohextrakt aus Neurospora crassa 0.5 - 3.0 IE/mg Protein (Definition der IE: 1 IE hydrolysiert pro Minute 1,0 µmol ß-NAD zu Nikotinamid und ADP-ribose bei pH 7,3 und 37 °C); Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, USA
- Natriumacetat wasserfrei
- Natriumazid reinst
- Perchlorsäure
- R 1881 (Methyltrienolon); Fa. New England Nuclear, Boston, USA
- Salzsäure 1 N, 25%, Faktor 1,000
- Schwefelsäure
- Serumalbumin vom Rind, trocken, reinst; Fa. Behring, Marburg
- Supirid, Dogmatil^R Amp.; 1 Amp. = 2 ml = 100 mg Sulpirid; Fa. Schürholz, München
- Trichloressigsäure
- Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan; Fa. Riedel-de Häen AG, Seelze-Hannover
- Unisolve I; Gelszintillator für wässriges und nichtwässriges Probenmaterial; Fa. Zinsser, Frankfurt

2.2.2. Radioaktive Verbindung

- ^{3}H-DHT (^{3}H-Dihydrotestosteron, [1,2-^{3}H(N)]-5α-Androstan-17ß-ol-3-on



M.W. 290.4
Radiochemische Reinheit größer als 98%
Spezifische Radioaktivität 51.6 Ci/mmol
Konzentration 0,25 mCi; 0,0014 mg in 0,25 ml
Fa. New England Nuclear, Boston, USA

2.3. Pufferlösungen

2.3.1. Michaelispuffer

44,6 g Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz, 29,4 g Natriumacetat und 0,7 g Natriumazid wurden in einem 5000 ml Meßkolben in 4900 ml Aqua dest. aufgelöst und auf 4 - 6 °C abgekühlt. Einstellen eines pH-Wertes von 8,2 mit etwa 70 ml 1 N HCl und Auffüllen mit Aqua dest. bis zur Marke; dabei durfte sich der pH-Wert nicht mehr ändern.

- Natriumdiäthylbarbiturat	0,040 M
- Natriumacetat	0,060 M
- Natriumazid	0,005 M

2.3.2. Tris-Puffer

6,06 g Tris-hydroxymethyl-aminomethan und 1,63 g Natrium-

azid wurden in 4900 ml Aqua dest. aufgelöst. Abkühlen auf 4 - 6 °C, einstellen des pH-Wertes 7,5 mit 25%iger HCl und auffüllen bis zur 5000 ml-Marke.

- Tris-(hydroxy-)methyl-aminomethan	0,010 M
- Natriumazid	0,005 M

2.3.3. DTT-Tris-Puffer

771 mg DTT wurden in einen 100 ml Meßkolben gegeben und mit Tris-Puffer aufgefüllt.

- Dithioerythrit	0,050 M
- Tris-(hydroxy-)methyl-aminomethan	0,010 M
- Natriumazid	0,005 M

2.3.4. DTT-Sucrose-Tris-Puffer (DST)

8,55 g Saccharose wurden in einen 100 ml Meßkolben gegeben, der mit DTT-Tris-Puffer bis zur Marke aufgefüllt wurde.

- Dithioerythrit	0,050 M
- Saccharose	0,250 M
- Natriumazid	0,005 M
- Tris-(hydroxy-)methyl-aminomethan	0,010 M

2.3.5. NAD-ase-DST-Puffer

2,3 mg NAD^+-Nucleosidase (0,7 IE/mg Protein) wurden in 2 ml DST-Puffer (2.3.4.) gelöst. Die Herstellung des Puffers erfolgte erst kurz vor dem Gebrauch aus dem bei -20 °C aufbewahrten DST-Puffer und der ebenfalls bei -20 °C auf-

bewahrten NAD-ase. Aktivität der NAD-ase: 0,8 IE in 1 ml DST.

2.4. Geräte

- Elektrophoreseapparatur:
  a) Elektrophoresewanne; Fa. Hölzel, Dorfen
  b) Kühlgerät UKT 2; Fa. Bühler, Tübingen
  c) Netzanschlußgerät; Fa. Desaga, Heidelberg
  d) Vorrichtung zum Gelplattenschneiden und Startlochstanzen; Entwicklung des MPI für Zellbiologie in Wilhelmshaven (Abt. Jungblut); Fa. Hölzel, Dorfen
  e) Vorrichtung zum Gelplattengießen; Fa. Hölzel, Dorfen
- Eppendorfpipetten; Fa. Eppendorf, Hamburg
- Eppendorfreaktionsgefäße 3810 1,5 ml; Eppendorf Gerätebau Fa. Netheler und Hinz GmbH, Hamburg
- Glasplatten 85 x 100 x 0,7 mm; Fa. Kästner, Tübingen
- Mikrodismembrator Typ 853067; Fa. Braun, Melsungen
- Mikropipette 5 µl; Oxford Lab., München
- Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen 13,5 ml, 16 x 76 mm; Fa. Beckman, München
- Rührgerät IKA-Cobmag REO; Fa. Janke und Kunkel, Staufen i. Br.
- Spektralphotometer M4Q III; Fa. Carl Zeiss, Oberkochen
- Szintillationszähler Rack Beta Liquid Scintillation Counter 1211-412; Efficiency ^{3}H: E% 62,0; Background ^{3}H: B 18,9 cpm; Serial No. 302428; Fa. LKB, München
- Szintillationszählröhrchen Zinsser-Polyvials R 174; Fa. Zinsser, Frankfurt
- Tarierwaage; Fa. Sauter, Ebingen
- Teflonkapseln 7 ml; Fa. Braun, Melsungen
- Trockenofen Tv40u; Fa. Memmert, Schwabach
- Ultrazentrifuge mit Zubehör:
  a) Beckman Ultrazentrifuge L5-65B; Fa. Beckman, München

b) Beckman Festwinkelrotor Typ 70.1 Ti; Fa. Beckman, München
- Waage, Halbmikrowaage bis max. 160 g; Fa. Sartorius, Göttingen
- Zelluloseacetatfolie, Katalog-Nr. 11200; Fa. Sartorius, Membranfilter GmbH, Göttingen

2.5. Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde die Methode von SCHAFFNER und WEISSMANN (1973) in der Modifikation nach MOELLER (1982) verwendet.

Jeweils 2 x 5 µl des mit Tris-Puffer im Verhältnis 1 : 1 verdünnten Cytosols (2.7.2.) wurden mit einer Oxfordpipette auf eine Zelluloseacetatfolie pipettiert, bei Zimmertemperatur getrocknet und bis zur Analyse gelagert.

Zur Proteinbestimmung bedeckte man die Folie 10 Minuten mit einer Färbelösung.

Färbelösung:

Amidoschwarz 10 B	1 g
Methanol	450 ml
Essigsäure 100%	100 ml
Aqua dest.	450 ml

Daraufhin wurde die Folie 3 Mal 3 Minuten in einer Entfärbelösung geschwenkt.

Entfärbelösung:

Methanol	1800 ml
Essigsäure 100%	40 ml
Aqua dest.	160 ml

Die noch gefärbten Proteinflecken wurden nach dem Trocknen aus der Folie herausgeschnitten und jeweils in einem Plastikröhrchen mittels 1 ml "Verflüssigungslösung" aufgelöst.

Verflüssigungslösung:	
Ameisensäure 98% - 100%	400 ml
Essigsäure 100%	50 ml
Trichloressigsäure	50 g

Die Röhrchen wurden verschlossen und deren Inhalt durch Schütteln vollständig durchmischt. Anschließend wurde die Extinktion bei 620 nm gemessen. Als Leerwert diente eine Folie, auf welche 5 µl DST aufpipettiert wurde.

Die Eichkurve wurde mit Rinderserumalbumin als Standard erstellt. Die Kurve war im bereich von 0,1 bis 6,0 mg Protein/ml linear.

2.6. DNA-Bestimmung

DNA wurde nach der Methode von BURTON (1956) bestimmt, jedoch unter Verwendung von Desoxyribose in den Standardlösungen.

Die aufgetauten Pellets (2.7.2.) wurden im Homogenisator nach POTTER und ELVEJHEM homogenisiert. 1 ml des Homogenats wurde mit 5 ml vorgekühltem Äthanol versetzt, 15 Minuten im Eisbad gerührt und anschließend bei 2 °C und 2500g 10 Minuten lang zentrifugiert. Mit dem Sediment wurde der oben für das Homogenat beschriebene Arbeitsgang wiederholt. Nun wurde das Sediment mit 5 ml kaltem 1 + 2 Äther-Äthanol-Gemisch versetzt, erneut 15 Minuten im Eisbad gerührt und 10 Minuten zentrifugiert. Auch dieser Arbeitsgang wurde wiederholt. Die bei den vier Zentrifuga-

tionen angefallenen Überstände wurden zur späteren Testosteronbestimmung gesammelt (2.9.).

Das nach der letzten Zentrifugation erhaltene Sediment wurde im Exsikkator getrocknet, so daß es nicht ganz austrocknet, und anschließend in 2,5 ml einer 0,5 N Perchlorsäure vollständig resuspendiert.

Diese Suspension stellte man 30 Minuten lang in ein 80 °C heißes Wasserbad, wobei, um ein Verdampfen zu verhindern, auf das Röhrchen eine Glasmurmel gelegt wurde. Danach wurde die Suspension bei 2500 g und Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand I in ein 5 ml Kölbchen gegeben. Das zurückgebliebene Sediment wurde erneut mit 2,5 ml einer 0,5 N Perchlorsäure versetzt, ins heiße Wasserbad gegeben und wie oben zentrifugiert. Der erhaltene Überstand II wurde zum Überstand I gegeben und mit 0,5 N Perchlorsäure auf 5 ml aufgefüllt.

Die DNA-Bestimmung wurde als Farbreaktion durchgeführt. Das dafür notwendige Diphenylamin-Reagenz ist lichtempfindlich und wurde daher erst gegen Ende des Versuchs hergestellt.

Diphenylamin-Reagenz

1,5 g Diphenylamin (reinst) wurden in 60 ml Eisessig in einem 100 ml Meßkolben aufgelöst. Nach vollständigem Auflösen gab man 1,5 ml konzentrierte Schwefelsäure dazu und füllte mit Eisessig bis zur Marke auf. Kurz vor Gebrauch der Reagenzes gab man noch 0,5 ml einer wässrigen Acetaldehydlösung dazu.

Acetaldehydlösung	
Acetaldehyd	20 µl
Aqua dest.	1 ml

Farbreaktion:
1 ml Überstand-Perchlorsäure-Lösung wurde mit 2 ml Diphenylamin-Reagenz vermischt und 14 bis 20 Stunden im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt. Anschließend wurde die Extinktion der Farbreaktion im Photometer bei 600 nm gegen den Leerwert gemessen.

Leerwert	
Perchlorsäure	1 ml
Diphenylaminreagenz	2 ml

Die Standardkurve wurde durch eine Desoxyribose-Verdünnungsreihe ermittelt und war im Bereich von 0,5 bis 11,0 µg Desoxyribose/ml linear.

2.7. Bestimmung des Androgenrezeptors

Die Rezeptoren wurden nach der Methode von WAGNER (1972, 1978) in der Modifikation nach MOELLER (1982) bestimmt.

2.7.1. Homogenisierung und Suspendierung

Die Homogenisierung des Prostatagewebes erfolgte mit dem Mikrodismembrator, der nach dem Prinzip der Kugelmühle arbeitet.

Die bei -70 °C tiefgefrorene Prostata (2.1.) gab man in eine mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte Teflonkapsel, die lose eine Wolframkarbidkugel von 10 mm Durchmesser enthielt. Die Kapsel wurde nochmals in flüssigem Stick-

stoff gekühlt, in den Mikrodismembrator eingespannt und mit einer Frequenz von 50 Hz bei variabler Amplitude 3 Mal 30 Sekunden geschüttelt, jeweils unterbrochen durch eine erneute Kühlung in flüssigem Stickstoff. Durch die Zwischenkühlung konnte eine Erwärmung des Gewebes über 0 °C vermieden werden.

Die Prostata war nun zu einem feinen Pulver zerstoßen. Dieses wurde bei 0 - 4 °C unter Zusatz von 4 Volumenteilen NAD-ase-DST-Puffer (2.3.5.) pro Gewichtsteil aufgetaut und sodann in dem NAD-ase-DST-Puffer suspendiert, in dem der Kapselinhalt mehrmals in eine Eppendorfpipette aufgezogen und wieder zurückgedrückt wurde.

2.7.2. Ultrazentrifugation

Die Ultrazentrifugation und alle nachfolgenden Schritte wurden bei Temperaturen zwischen 0 °C und 4 °C durchgeführt.

Die erhaltene Suspension wurde in ein Polycarbonatröhrchen pipettiert und eine Stunde lang bei 100.000 g zentrifugiert. Danach erhielt man auf dem Grund des Röhrchens das Sediment (Pellet), darüber befanden sich das Cytosol und die Lipidschicht. Das Cytosol wurde mit einer vorgekühlten Plastikspritze, auf die eine abgeschliffene Lumbalkanüle aufgesetzt war, abgesogen und zur Rezeptor- und Proteinbestimmung (2.7.3. bzw. 2.5.) weiterverwandt. Die Lipidschicht wurde verworfen, der Pellet 3 Mal mit je 1 ml Tris-Puffer gewaschen und zusammen mit 3 ml Tris-Puffer in einem Reagenzglas bis zur DNA- und Testosteronbestimmung (2.6. und 2.9.) bei -20 °C eingefroren.

2.7.3. Inkubation

Im Cytosol erfolgte die Markierung des Androgenrezeptors durch Inkubation mit radioaktivem Dihydrotestosteron (^{3}H-DHT). Da DHT auch unspezifisch mit hoher Kapazität gebunden wird, waren zwei Ansätze nötig, um später die spezifische Bindung ermitteln zu können.

Ansatz 1
10 µl Tris-Puffer
80 µl DST
10 µl ^{3}H-DHT 4 x 10^{-7} M
100 µl Cytosol

Ansatz 2
10 µl R 1881 4 x 10^{-5} M
80 µl DST
10 µl ^{3}H-DHT 4 x 10^{-7} M
100 µl Cytosol

Ansatz 2 enthielt zusätzlich zum radioaktiven Steroid unmarkiertes R 1881 in hundertfachem Überschuß und wurde als 'supprimierter' Ansatz bezeichnet. Ansatz 1 wurde 'nicht supprimierter' Ansatz genannt. Die Ansätze wurden im Dunkeln bei 0 - 4 °C parallel 24 Stunden inkubiert. Beide Ansätze enthielten 2,0 x 10^{-8} M ^{3}H-DHT, Ansatz 2 zusätzlich 2,0 x 10^{-6} M unmarkiertes R 1881.

2.7.4. Agargelelektrophorese

Der radioaktiv markierte Androgenrezeptor wurde mit Hilfe der Agargelelektrophorese von einem Großteil des nicht spezifisch gebundenen radioaktiven Hormons getrennt.

Das Elektrophoresegel wurde auf Glasplatten gegossen, denen

zur besseren Haftung des Gels zuvor eine dünne Schicht von Agar purum aufgetrocknet wurde. Dazu wurden die Glasplatten mit Methanol entfettet, bei 100 °C getrocknet, anschließend mit 7 ml einer heißen Agar purum-Lösung (50 mg Agar purum in 100 ml Aqua dest.) beschichtet und nochmals ungefähr eine Stunde bei 100 °C im Trockenofen getrocknet.

Zur Herstellung des Gels wurden 1,1 g Agar purum und 0,12 g Agarose L in 68 ml Michaelispuffer gegeben und unter Rühren und Erhitzen bis zum Sieden gelöst. Diese Agarlösung goß man in eine exakt waagerecht stehende Plexiglasform, in der 2 beschichtete Glasplatten lagen. Die Luftblasen, die sich hierbei unter den Glasplatten bildeten, wurden mit dem Spatel herausgedrückt. Nach dem Gelieren konnte man die Gelplatten in der Gußform bei 0 - 4 °C bis zu 24 Stunden lagern. Sie wurden daher schon am Vortag hergestellt und im Kühlraum aufbewahrt. Sie enthielten 0,81% Agar purum und 0,09% Agarose L in 0,05 M Michaelispuffer.

Eine Stunde vor Elektrophoresebeginn wurde die Kühlapparatur eingeschaltet. Dadurch wurde der Kühlblock mit -6 °C kaltem Isopropanol durchströmt, und die Temperatur des Agargels konnte somit während der Elektrophorese zwischen 3 °C und 5 °C gehalten werden.

Unmittelbar vor Gebrauch wurden die Gelplatten zurechtgeschnitten. In die Mittellinie parallel zur kleineren Kantenlänge stanzte man 10 Startlöcher (Ø 3,6 mm, Abstand 9 mm) zur Aufnahme der Proben. Anschließend wurden die Platten luftblasenfrei auf den Kühlblock der Elektrophoresekammer aufgelegt. Das elektrische Feld wurde senkrecht zur Reihe der Startlöcher angelegt. Als Elektrodenpuffer fand 0,1 M Michaelispuffer Verwendung. Als Ionenbrücken diente Filterpapier.

In die Startlöcher der Bahnen 2,4,7 und 9 wurden jeweils

50 µl eines 24 Stunden inkubierten Ansatzes pipettiert. Die sich anschließende Elektrophorese dauerte zwei Stunden. Der Strom wurde dabei konstant auf 90 mA pro Gelplatte gehalten.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die im Startloch verbliebene Flüssigkeit abgesaugt und in ein Betazählröhrchen gegeben. Danach wurde das Gel zunächst in 10 Längsbahnen und dann in 26 Fraktionen von 3 mm Breite senkrecht zur Feldrichtung geschnitten, so daß insgesamt 10 Bahnen zu jeweils 26 Fraktionen entstanden. Die überstehenden Ränder wurden verworfen. Auf der anodischen Seite beginnend wurden die Fraktionen fortlaufend durchnummeriert, so daß das Startloch jeder Bahn auf der Grenze zwischen Fraktion 13 und 14 lag. Die 26 Gelfraktionen jeder beschickten Bahn wurden gemäß dem folgenden Schema in Betazählröhrchen gegeben:

Fraktion	1 + 2	-	Röhrchen 1
Fraktion	3	-	Röhrchen 2
Fraktion	4	-	Röhrchen 3
.			.
.			.
Fraktion	14	-	Röhrchen 13
Fraktion	15 + 16	-	Röhrchen 14
Fraktion	17 + 18	-	Röhrchen 15
.			.
.			.
Fraktion	25 + 26	-	Röhrchen 19
Startloch-flüssigkeit		-	Röhrchen X

Jedes Zählröhrchen wurde mit 10 ml Unisolve I aufgefüllt. Die radioaktiven Moleküle wurden innerhalb von 24 Stunden zu 97% - 100% in die Szintillationsflüssigkeit extrahiert. Anschließend wurde die ß-Aktivität des ^{3}H-DHT über 10 Minuten im Szintillationszähler gezählt und der Mittelwert in cpm ausgedruckt.

Es fand sich ein anodischer und ein kathodischer Peak von radioaktiven Verbindungen. Nach Literaturangaben (u.a. WAGNER 1978) ist im anodischen Peak das rezeptorgebundene Hormon enthalten, während der kathodische Peak im wesentlichen freies und unspezifisch gebundenes Hormon enthält.

2.7.5. Tabellarische und graphische Darstellung der Ergebnisse der Agargelelektrophorese

Nachdem die Radioaktivität der einzelnen Gelstücke im Szintillationszähler bestimmt worden war, erfolgte die tabellarische und graphische Darstellung der gefundenen Meßwerte (Tab. 1 und Abb. 1).

In die Tabelle wurden die Zählraten der in den Röhrchen gefundenen Radioaktivität eingetragen. Dabei wurden die Meßwerte des nichtsupprimierten Ansatzes (Ansatz 1) und des supprimierten Ansatzes (Ansatz 2) einander gegenübergestellt. Röhrchen 1 bis 12 repräsentieren die anodische, Röhrchen 13 bis 19 die kathodische Seite der Gelplatte. In der Spalte sind die Zählratendifferenzen der anodischen Fraktionen der beiden Ansätze angegeben. Aufsummiert entsprechen sie der supprimierbaren Bindung (Zeile Δ), die nach der Formel von OETTLING (Dissertation Tübingen, in Vorbereitung; 2.8.) rechnerisch korrigiert wird (Zeile Δcorr). In die Zeile X wurde die Zählrate der nach Beendigung der Elektrophorese im Startloch verbliebenen Flüssigkeit eingetragen. In der Zeile A bzw. B wurden die cpm für die anodische und kathodische Seite getrennt aufsummiert, in der Zeile A + B für jeden Ansatz insgesamt angegeben. Im Idealfall ist bei beiden Ansätzen die Summe A + B + X gleich groß, d.h. der Quotient beider Summen gleich 1. Versuche bei denen dieser Quotient nicht im Bereich von 0,95 bis 1,05 gelegen hätte, wären aus der Wertung gefallen.

Röhrchen Nr.	Versuch C.4. Ansatz 1	Δ	Ansatz 2
1	106	1	105
2	60	4	56
3	64	11	53
4	117	33	141
5	271	54	217
6	494	62	432
7	762	124	638
8	1697	165	1532
9	1563	24	1539
10	847	0	847
11	448	25	413
12	425	60	365
A	6854		6281
Δ		573	
X	0		0
13	237		249
14	1427		1524
15	10552		11584
16	32827		33109
17	12622		10838
18	466		392
19	90		90
B	58221		57786
A + B	65075		64067
Δcorr		526	

Tab. 1: Tabellarische Auflistung der Zählraten der in den einzelnen Röhrchen gefundenen Radioaktivität. Versuch Nr. C.4.

Auf der Abszisse der graphischen Darstellung (Abb. 1) sind die einzelnen Gelfraktionen 1 - 26 aufgetragen, auf der Ordinate die counts per minute. Die linke Seite des Schaubilds mit den Gelfraktionen 1 - 13 entspricht der anodischen Seite der Agargelplatte. Die durchgezogene Linie zwischen den Fraktionen 13 und 14 markiert den Startpunkt der Elektrophorese. Die rechte Seite des Schaubilds mit den Fraktionen 14 - 26 entspricht der kathodischen Seite der Gelplatte. Da sich auf der Kathodenseite die größte Menge der nicht rezeptorgebundenen ^{3}H-DHT-Moleküle befand, wurde dort ein größerer Ordinatenmaßstab nötig. Ab Fraktion 14 wurde die Aktivität zweier Gelstücke zusammen gemessen, da eine genaue Auflösung auf der Kathodenseite nicht erforderlich war.

Die schwarzen Punkte in dem Schaubild entsprechen Ansatz 1, dem nichtsupprimierten Ansatz. Auf der anodischen Seite (Fraktionen 1 - 13) erhält man für Ansatz 1 den Peak A_1, auf der kathodischen Seite (Fraktionen 14 - 26) den Peak B_1. Die schwarzen Dreiecke stehen für den supprimierten Ansatz 2. Entsprechend erhält man aus Ansatz 2 den anodischen Peak A_2 und den kathodischen Peak B_2. Die offenen Dreiecke stellen die Differenz $\Delta = A_1 - A_2$ dar.

2.8. Berechnung der Rezeptormenge

Die von Zähler angegebenen Zählraten der einzelnen Röhrchen wurden bei beiden Ansätzen auf der anodischen und kathodischen Seite aufsummiert. Die Differenz der beiden anodischen Summen wird supprimierbare Bindung genannt und als die spezifische Bindung des ^{3}H-DHT an den Rezeptor im nichtsupprimierten Ansatz angesehen. Nach einem Vorschlag von OETTLING (Dissertation Tübingen, in Vorbereitung) wurde die supprimierbare Bindung mit dem Quotienten der kathodischen Peaks korrigiert:

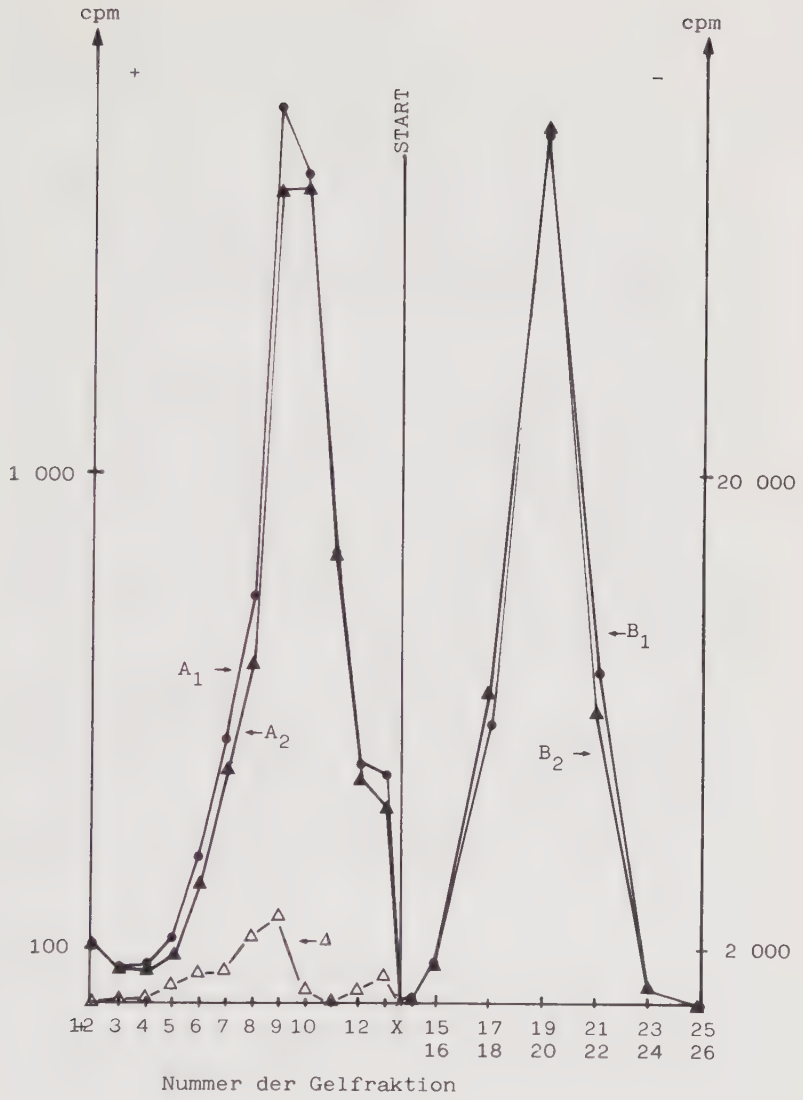


Abb. 1: Graphische Darstellung der in den einzelnen Gelfraktionen gefundenen Radioaktivität. Versuch Nr. C.4.

$$\Delta \text{corr} = A_1 - A_2 \times \frac{B_1}{B_2}$$

A_1 = cpm auf der anodischen Seite des nichtsupprimierten Ansatzes

A_2 = cpm auf der anodischen Seite des supprimierten Ansatzes

B_1 = cpm auf der kathodischen Seite des nichtsupprimierten Ansatzes

B_2 = cpm auf der kathodischen Seite des supprimierten Ansatzes

Die Formel zur Umrechnung der korrigierten Zählrate für die supprimierbare Bindung, counts per minute (cpm), in fmol Bindungskapazität ergibt sich folgendermaßen:

Bei der Effektivität des Zählgerätes von 60% und der Definition der Einheit Curie: 1 Ci = $2{,}22 \times 10^{12}$ dpm gilt:

$$1 \text{ cpm} = \frac{100}{60} \text{ dpm}$$

$$1 \text{ cpm} = \frac{100}{60 \times 2{,}22 \times 10^{12}} \text{ Ci}$$

Aufgrund der spezifischen Aktivität des radioaktiven Liganden von 51,6 Ci/mmlo = $51{,}6 \times 10^{-12}$ Ci/fmol ergibt sich:

$$1 \text{ cpm} \hat{=} \frac{100}{60 \times 2{,}22 \times 51{,}6} \text{ fmol}$$

Somit wird die Zählrate (angegeben in cpm) gemäß der folgenden Formel in fmol Bindungsstellen umgerechnet:

$$\Delta \text{corr} \quad [\text{cpm}] \quad \hat{=} \quad \Delta \text{corr} \times \frac{100}{60 \times 2{,}22 \times 51{,}6} \quad [\text{fmol}]$$

$$\hat{=} \quad \Delta \text{corr} \times 1{,}4549 \times 10^{-2} \quad [\text{fmol}]$$

2.9. Weitere Methoden

Die Konzentrationen der Hormone in Serum und Pellet wurden radioimmunologisch gemessen, Testosteron mit den Reagentien der Firma Wien (Succasunna, New Jersey), Prolaktin mit den für Rattenprolaktin spezifischen Reagentien des NIAMD (RP 1)

2.10. Statistische Auswertung

Der statistische Vergleich zweier Gruppen erfolgte mit dem Wilcoxon's signed rank test. Korrelationen wurden mit dem Spearmann'schen Rang Koeffizienten beschrieben (Wissenschaftliche Tabellen Geigy 1980).

3. ERGEBNISSE

3.1. Tabellen der Primär- und abgeleiteten Daten

Ausgewertet wurden die Ergebnisse von 20 Kontrolltieren und 20 behandelten Tieren (2.1.). Die primären Daten (A - K) und die daraus errechneten Werte (L - O) werden zunächst tabellarisch angegeben (Tab. 2 - Tab. 5).

Legende zu den folgenden Tabellen:

A Versuchsnummer

B Gewicht des Tieres in g

C Prostatagewicht des Tieres in mg

D Cytosolmenge in µl

E Δcorr in cpm/50µl Cytosol

F DNA/Pellet in µg

G µg Protein/50µl Cytosol

H Konzentration von Prolaktin im Serum in µg/l

I Konzentration von Testosteron im Serum in ng/dl

K Testosteronmenge/Pellet in pg

L Testosteronkonzentration im Pellet in pg/µg DNA

M Rezeptorkonzentration im Cytosol in fmol/mg Prostata

N Rezeptorkonzentration im Cytosol in fmol/mg Protein

O Rezeptorkonzentration im Cytosol in fmol/µg DNA

Tabelle 2

A	A.1.	A.2.	A.3.	A.4.	A.5.	A.6.	A.7.	A.8.	A.9.	A.10.
B	218	210	222	210	220	228	230	226	206	230
C	164	246	231	232	160	271	257	203	165	220
D	0,83	1,23	1,16	1,16	0,80	1,36	1,29	1,02	0,83	1,10
E	520	455	631	283	341	684	559	825	280	543
F	420	450	400	310	300	450	390	370	220	310
G	350	460	700	740	480	450	680	640	480	560
H	54,5	28,2	531,0	41,7	85,6	181,6	276,3	86,9	54,9	56,3
I	474	667	163	215	316	699	520	559	211	272
K	162	130	24	176	82	166	1417	237	133	192
L	0,39	0,29	0,02	0,57	0,27	0,37	3,64	0,65	0,60	0,62
M	1,46	1,27	1,77	0,79	0,95	1,92	1,57	2,32	0,79	1,52
N	41,6	27,7	25,2	10,7	19,9	42,6	23,0	36,1	16,3	27,2
O	569	696	1025	593	509	1158	1035	1274	592	1079

Tab. 2: Ergebnisse der Versuchsgruppe A (Kontrollgruppe zu Versuchsgruppe B)

Tabelle 3

A	B.1.	B.2.	B.3.	B.4.	B.5.	B.6.	B.7.	B.8.	B.9.	B.10.
B	210	212	212	218	206	208	208	220	220	218
C	226	202	239	176	209	150	205	286	263	315
D	1,13	1,01	1,20	0,88	1,05	0,75	1,03	1,43	1,32	1,58
E	418	330	618	567	585	437	279	279	604	278
F	420	280	375	380	425	420	240	400	500	450
G	530	470	530	560	420	450	720	600	600	520
H	133,4	343,9	211,3	122,2	92,7	449,0	195,0	167,9	168,7	154,0
I	381	787	598	444	808	355	511	257	669	607
K	165	557	36	268	138	105	1334	156	404	383
L	0,39	1,99	0,10	0,71	0,33	0,25	5,56	0,39	0,81	0,85
M	1,17	0,92	1,74	1,59	1,65	1,22	0,79	0,78	1,70	0,87
N	22,1	19,7	32,6	28,4	39,0	27,2	10,9	13,0	28,2	15,0
O	630	397	1107	735	809	437	671	559	893	547

Tab. 3: Ergebnisse der Versuchsgruppe B (2 Stunden nach Gabe von Sulpirid)

Tabelle 4

A	C.1.	C.2.	C.3.	C.4.	C.5.	C.6.	C.7.	C.8.	C.9.	C.10.
B	220	220	216	226	224	222	228	220	226	222
C	224	180	206	207	124	173	181	201	216	218
D	1,12	0,90	1,03	1,04	0,62	0,87	0,91	1,01	1,08	1,09
E	650	719	1007	526	348	602	319	538	561	1307
F	240	370	400	450	225	320	240	260	110	375
G	550	490	700	460	500	520	680	640	600	600
H	172,1	85,5	60,2	49,2	9,4	31,8	13,8	208,7	70,0	44,4
I	335	231	102	376	760	173	244	131	399	129
K	200	58	83	100	80	92	616	511	478	185
L	0,83	0,16	0,21	0,22	0,36	0,29	2,57	1,97	4,35	0,49
M	1,82	2,01	2,82	1,48	0,97	31,8	13,8	208,7	70,0	44,4
N	33,1	41,1	40,3	32,0	19,5	32,4	13,1	23,5	26,2	61,0
O	1699	979	1452	681	537	917	677	1170	3084	2127

Tab. 4: Ergebnisse der Versuchsgruppe C (Kontrollgruppe zur Versuchsgruppe D)

Tabelle 5

A	D.1.	D.2.	D.3.	D.4.	D.5.	D.6.	D.7.	D.8.	D.9.	D.10.
B	224	210	220	222	216	224	222	216	238	228
C	265	159	200	265	203	209	210	224	117	206
D	1,33	0,80	1,00	1,33	1,02	1,05	1,05	1,12	0,59	1,03
E	468	225	470	706	550	853	414	352	232	600
F	240	360	440	460	390	490	300	410	340	300
G	560	440	560	480	390	600	620	660	460	500
H	292,0	265,3	58,6	106,0	93,9	99,1	72,3	177,6	79,6	54,6
I	406	428	196	428	434	159	508	279	388	195
K	152	75	171	10	184	198	2743	1282	182	168
L	0,63	0,21	0,39	0,02	0,47	0,33	4,42	1,94	0,40	0,34
M	1,32	0,63	1,32	1,98	1,55	2,40	1,16	0,99	0,66	1,68
N	23,4	14,3	23,5	41,2	39,5	39,8	18,7	15,0	14,1	33,6
O	1452	280	598	1143	806	1024	811	538	225	1154

Tab. 5: Ergebnisse der Versuchsgruppe D (5 Stunden nach Gabe von Sulpirid)

3.2. Konzentration von Prolaktin im Serum

Die Prolaktinkonzentration im Serum war in den mit Sulpirid behandelten Gruppen gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen signifikant ($p < 0,05$) erhöht (Abb. 2).

	Median	Bereich	Einheit
Gruppe A	70,95	28,2 - 531,0	µg/l
Gruppe B	168,30	92,7 - 449,0	µg/l
	$p < 0,05$		
Gruppe C	54,70	9,4 - 208,7	µg/l
Gruppe D	96,50	54,6 - 292,0	µg/l
	$p < 0,05$		

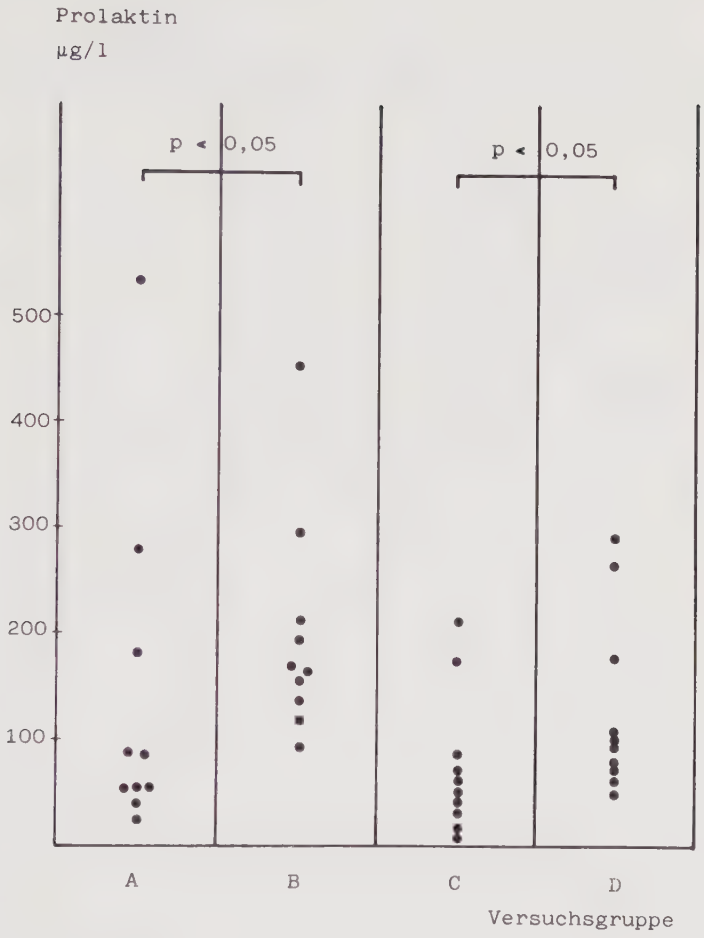


Abb. 2: Konzentration des Prolaktins im Serum

Gruppe A: 2 Stunden nach Injektion von NaCl
Gruppe B: 2 Stunden nach Injektion von Sulpirid
Gruppe C: 5 Stunden nach Injektion von NaCl
Gruppe D: 5 Stunden nach Injektion von Sulpirid

3.3. Konzentration von Testosteron im Serum

Die Behandlung mit Sulpirid führte zu keiner signifikanten Änderung der Testosteronkonzentration im Serum (Abb. 3).

	Median	Bereich	Einheit
Gruppe A	395,0	163 - 699	ng/dl
Gruppe B	554,5	257 - 787	ng/dl
	$p > 0,1$		
Gruppe C	237,5	102 - 699	ng/dl
Gruppe D	397,0	159 - 508	ng/dl
	$p > 0,1$		

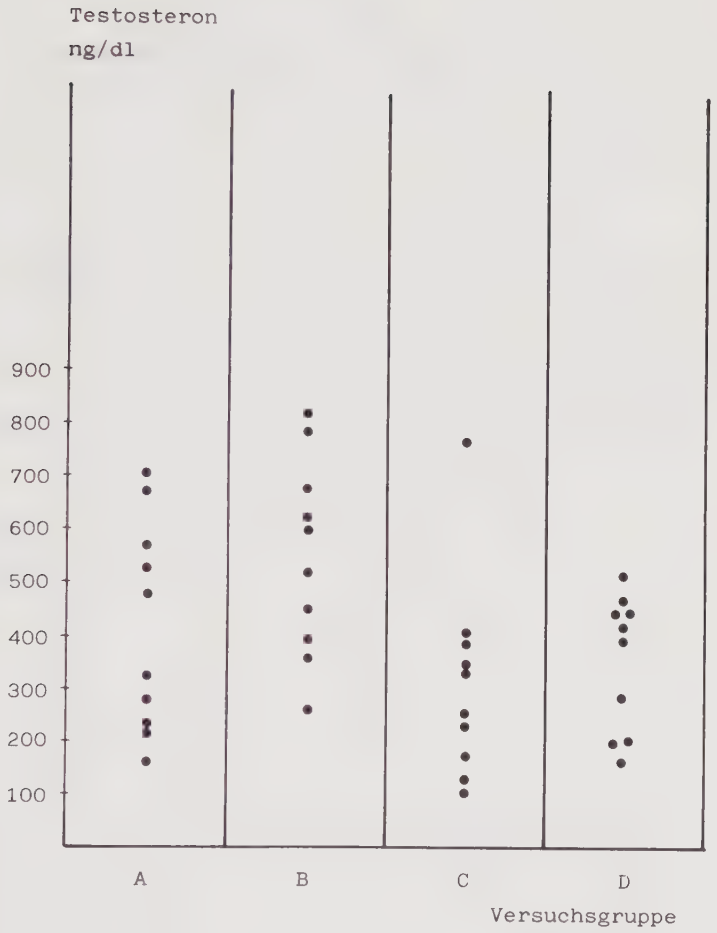


Abb. 3: Konzentration des Testosterons im Serum

Gruppe A: 2 Stunden nach Injektion von NaCl
Gruppe B: 2 Stunden nach Injektion von Sulpirid
Gruppe C: 5 Stunden nach Injektion von NaCl
Gruppe D: 5 Stunden nach Injektion von Sulpirid

3.4. Konzentration von Testosteron im Pellet

Die Testosteronkonzentration im Pellet lag zwischen 0,02 und 5,56 ng/µg DNA. Signifikante Unterschiede bestanden nicht (Abb. 4).

	Median	Bereich	Einheit
Gruppe A	0,480	0,02 - 3,64	pg/µg DNA
Gruppe B	0,550	0,10 - 5,56	pg/µg DNA
	$p > 0,1$		
Gruppe C	0,425	0,16 - 4,35	pg/µg DNA
Gruppe D	0,395	0,02 - 4,42	pg/µg DNA
	$p > 0,5$		

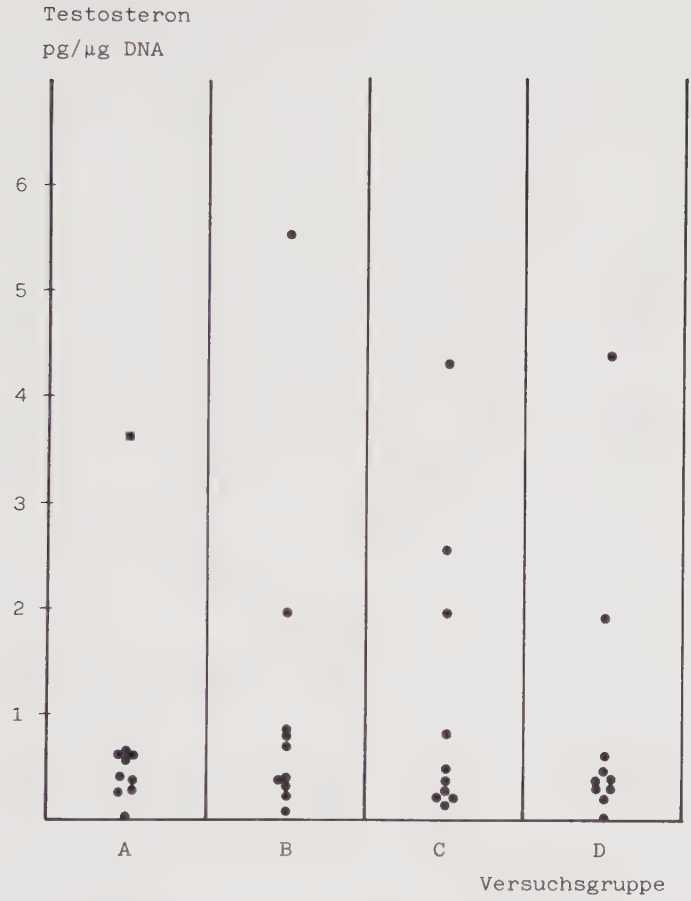


Abb. 4: Konzentration des Testosterons im Pellet, bezogen auf DNA

Gruppe A: 2 Stunden nach Injektion von NaCl
Gruppe B: 2 Stunden nach Injektion von Sulpirid
Gruppe C: 5 Stunden nach Injektion von NaCl
Gruppe D: 5 Stunden nach Injektion von Sulpirid

3.5. Rezeptorkonzentration im Cytosol

Die Zahl der Rezeptorbindungsstellen wurde bezogen auf den Proteingehalt des Cytosols und den DNA-Gehalt des Pellets angegeben. Eine signifikante Änderung der Rezeptorkonzentration ergab sich weder zwei noch fünf Stunden nach Injektion von Sulpirid (Abb. 5 und Abb. 6).

	Median	Bereich	Einheit
Gruppe A	26,2	10,7 - 41,6	fmol/mg Protein
Gruppe B	27,2	13,0 - 41,6	fmol/mg Protein
	$p > 0,5$		
Gruppe C	32,2	13,1 - 61,0	fmol/mg Protein
Gruppe D	23,5	15,0 - 41,2	fmol/mg Protein
	$p > 0,1$		

	Median	Bereich	Einheit
Gruppe A	959,0	596 - 1274	fmol/mg DNA
Gruppe B	650,5	397 - 1107	fmol/mg DNA
	$p > 0,1$		
Gruppe C	1162,0	537 - 3084	fmol/mg DNA
Gruppe C	808,5	225 - 1452	fmol/mg DNA
	$p > 0,1$		

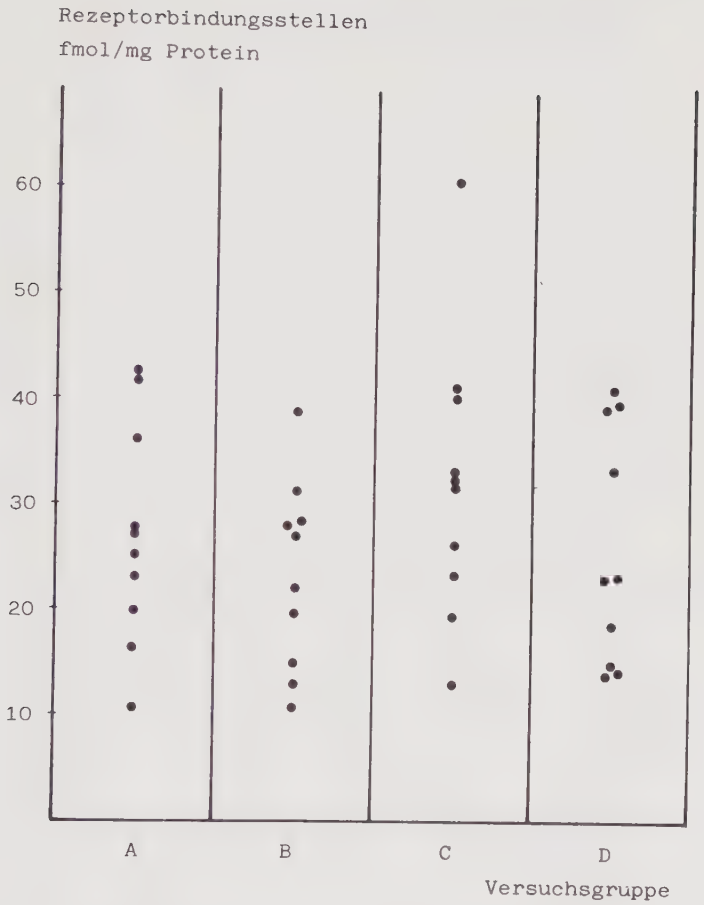


Abb. 5: Rezeptorbindungsstellen im Cytosol, bezogen auf lösliches Protein

Gruppe A: 2 Stunden nach Injektion von NaCl
Gruppe B: 2 Stunden nach Injektion von Sulpirid
Gruppe C: 5 Stunden nach Injektion von NaCl
Gruppe D: 5 Stunden nach Injektion von Sulpirid

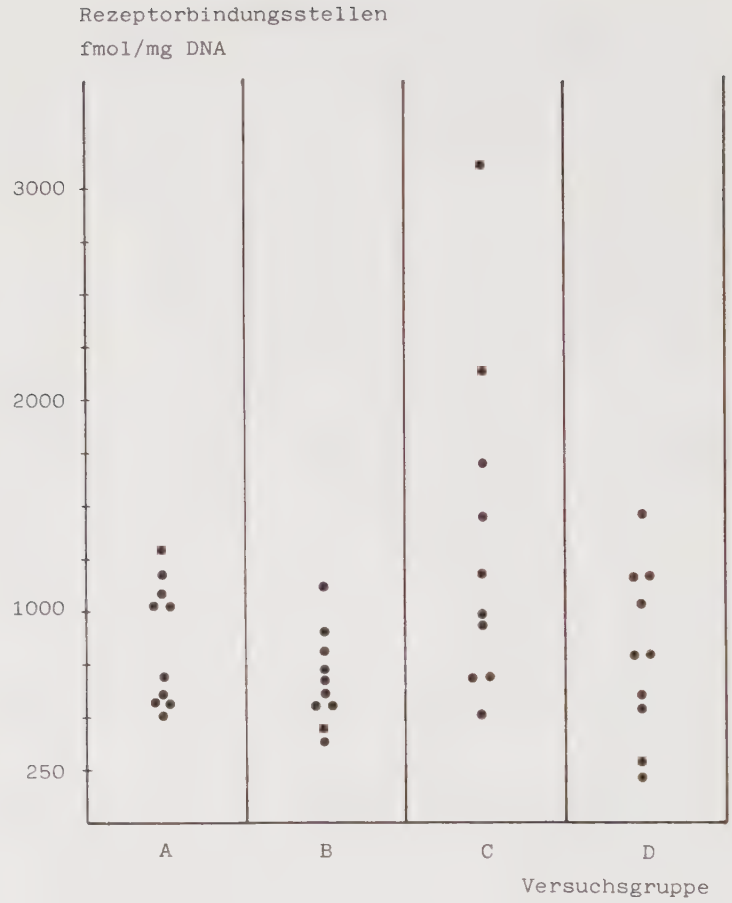


Abb. 6: Rezeptorbindungsstellen im Cytosol, bezogen auf DNA

Gruppe A: 2 Stunden nach Injektion von NaCl
Gruppe B: 2 Stunden nach Injektion von Sulpirid
Gruppe C: 5 Stunden nach Injektion von NaCl
Gruppe D: 5 Stunden nach Injektion von Sulpirid

3.6. Korrelation der Konzentration von Prolaktin im Serum mit der Rezeptorkonzentration (fmol/mg DNA)

Unter Einbeziehung der Werte aller vier Gruppen fand sich keine Korrelation zwischen der Konzentration des Prolaktins im Serum und der Rezeptorkonzentration bezogen auf DNA.

Gruppen A - D $\rho = 0{,}130$ $p > 0{,}1$

3.7. Korrelation der Konzentration von Testosteron im Serum mit der Rezeptorkonzentration (fmol/mg DNA)

Es ergab sich keine Korrelation zwischen der Konzentration des Testosterons im Serum und der Rezeptorkonzentration in fmol/mg DNA.

Gruppen A - D $\rho = -0{,}207$ $p > 0{,}1$

3.8. Korrelation der Konzentration von Prolaktin im Serum mit der Konzentration von Testosteron im Pellet

Unter Berücksichtigung der Werte aller vier Gruppen fand sich keine Korrelation zwischen der Konzentration von Prolaktin im Serum und der Konzentration von Testosteron im Pellet.

Gruppen A - D $\rho = 0{,}085$ $p > 0{,}1$

4. DISKUSSION

Ausgehend von der Hypothese, Prolaktin reguliere den Androgenrezeptor in der ventralen Prostata der Ratte, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine akute Erhöhung der Prolaktinkonzentration im Serum eine Steigerung der Androgenrezeptorkonzentration induziert.

Die erhöhte Prolaktinkonzentration wurde durch eine einmalige intraperitoneale Injektion des Neuroleptikums Sulpirid erzielt. Um ein möglicherweise verzögertes Ansprechen der Rezeptorregulation auf die veränderte Prolaktinkonzentration im Serum zu berücksichtigen, wurden die Versuchsparameter zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, zwei und fünf Stunden nach Injektion von Sulpirid, bestimmt.

Zur Beurteilung einer möglichen Beeinflussung der Rezeptorkonzentration durch zirkulierende Androgene wurde zusätzlich die Testosteronkonzentration im Serum der Tiere gemessen.

Die Testosteronkonzentration im 100.000 g-Sediment diente als Parameter für die nukleäre Rezeptorkonzentration. Sie wurde gemessen, um zu untersuchen, inwiefern die Translokation des Rezeptors in den Kern beeinflußt wurde.

4.1. Analytische Verfahren

4.1.1. Lagerung und Homogenisierung des Untersuchungsmaterials

Die Prostaten wurden sofort nach der Entnahme in Eppendorf-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -70 °C bis zu sieben Wochen aufbewahrt. Nach MOELLER (1982) ist bei diesen Bedingungen

mindestens eine achtwöchige Lagerung ohne nennenswerten Rezeptorverlust möglich.

Die Homogenisierung des Prostatagewebes erfolgte mit dem Mikrodismembrator, welcher nach Untersuchungen von WAGNER und JUNGBLUT (1976) an Mammakarzinomgewebe gegenüber dem Potter-Homogenisator und dem Ultraturrax die größte Ausbeute an meßbarem Rezeptor erbrachte.

4.1.2. Markierung des Rezeptors

Der Rezeptor wurde mit ^{3}H-DHT markiert, das von den verfügbaren Liganden die höchste Affinität zum Androgenrezeptor besitzt (MOELLER u.a. 1983b). DHT wird jedoch nicht nur vom Rezeptor, sondern auch von SHBG mit hoher Affinität gebunden. Außerdem dann DHT während der Inkubation zu 5 α-Androstandiolen hydriert werden, welche nicht an den Rezeptor gebunden werden.

Die störende Bindung an SHBG kann durch die Agarelektrophorese nach WAGNER (1972) eliminiert werden, sie ist hier jedoch nicht von Bedeutung, da die Ratte kein SHBG besitzt (MURPHY 1968, RENOIR u.a. 1980, MOELLER u.a. 1983b).

Durch Inkubation mit NAD-ase kann die Metabolisierungsrate von DHT vermindert werden. Die NAD^{+}-Nukleosidase zerstört die Pyridinnukleotide, welche als Protonendonatoren für die Hydrierung von DHT durch die 3-Hydroxy-Steroid-Dehydrogenasen dienen. Nach MOELLER (1982) ist eine Konzentration von 400 mE NAD-ase/ml Inkubationsvolumen ausreichend, um den Verlust an ^{3}H-DHT innerhalb von 24 Stunden auf 10% bis 20% zu beschränken.

DHT wird desweiteren unspezifisch und mit hoher Kapazität von in der Cytosolfraktion vorkommenden Serumproteinen

(vor allem Albumin (SANDBERG u.a. 1967)) gebunden, wodurch zusätzliche Trennverfahren zur Bestimmung der spezifischen Bindung von ^{3}H-DHT an den Rezeptor erforderlich werden (4.1.4. und 4.1.5.).

4.1.3. Inkubationszeit und -temperatur

Es wurde eine Inkubationszeit von 24 Stunden gewählt, wodurch der schnell und langsam markierbare Anteil des Rezeptors erfaßt werden (SNOCHOWSKI u.a. 1977, MENON u.a. 1978). Der schnell markierbare Anteil entspricht vorwiegend dem freien, nicht hormonbesetzten Rezeptor und wird bei Inkubationszeiten von einer bis zwei Stunden bestimmt. Bei längeren Inkubationszeiten wird durch Austauschvorgänge mit dem radioaktiven Liganden auch ein Teil des mit endogenem Hormon besetzten Androgenrezeptors erfaßt. Eine Inkubationsdauer über 25 Stunden erscheint auf Grund des zunehmenden Abbaus des Rezeptormoleküls nicht sinnvoll. MOELLER (1982) findet in den ersten Inkubationsstunden 30% bis 60%, nach 16 - 25 Stunden 100% und nach 43 Stunden nur noch 73% des meßbaren Rezeptors.

Die Inkubation erfolgte bei 0 - 4 °C, da höhere Temperaturen auf Grund der Thermolabilität des Rezeptors zunehmende Verluste mit sich bringen würden.

4.1.4. Abtrennung des markierten Rezeptors

Die Methode der Agargelelektrophorese wurde von WAGNER (1972) für steroidbindende Serumproteine und Steroidrezeptoren eingeführt. Die anionischen Säurereste des Agars sind in der Gelmatrix fest verankert, wogegen die assoziierten Kationen zusammen mit ihrem Hydratwasser vom elektrischen Feld zur Kathode transportiert werden, wodurch

ein Lösungsmittelfluß zur Kathode entsteht (sog. endosmotischer Pufferstrom). Dieser Lösungsmittelfluß spült die ungeladenen und ungebundenen Liganden in Richtung Kathode. Der kathodische Peak enthält darüber hinaus den größten Anteil der unspezifisch gebundenen Liganden. In einem nur wenig vom Startloch entfernten kathodischen Peak finden sich die an SHBG oder mikrosomalen Rezeptor gebundenen Liganden. Die an saure cytoplasmatische und nukleäre Rezeptoren gebundenen Liganden wandern in Richtung Anode.

Die bei der Untersuchung von Rattengewebe wichtigen Albumin-Steroid-Komplexe finden sich im anodischen Teil der Platte, dissoziieren jedoch während der zweistündigen Elektrophorese fast vollständig, wobei das freigesetzte Hormon dann durch den endosmotischen Pufferstrom in Richtung Kathode transportiert wird (WAGNER 1978).

Ebenso kommt es während der Elektrophorese zu einer Abdissoziation spezifisch gebundener Liganden, wodurch sich die Ausbeute an Rezeptorbindungsstellen vermindert. Alle mit dem Lösungsmittelfluß abtransportierten abdissoziierten Liganden können auf ihrem Weg zur Kathode erneut an Proteine binden und auch wieder abdissoziieren. Durch Bindung der angefluteten Liganden an vermutlich bei der Inkubation entstandene, langsam zur Anode wandernde Proteinaggregate mit sehr hoher Bindungskapazität kann es zum Entstehen startlochnaher anodischer Peaks kommen.

Mit der Agarelektrophorese lassen sich somit saure cytoplasmatische und nukleäre Rezeptoren von mikrosomalen Rezeptoren, SHBG und dem größten Teil der ungeladenen und ungebundenen sowie unspezifisch gebundenen Liganden trennen.

In einem von JUNGBLUT u.a. (1972) veröffentlichten Vergleich verschiedener Separierungsmethoden erzielten die

Agarelektrophorese und die Gelfiltration mit Sephadex G 25 gegenüber dem Charcolassay, der Fällung mit Protaminsulfat und der Zentrifugation im Dichtegradienten die größten relativen Ausbeuten an Rezeptorbindungsstellen.

Leider ist mit keiner Separierungsmethode eine vollständige Trennung spezifisch gebundener Liganden von den restlichen Liganden möglich und somit wurde ein zusätzliches Verfahren zur Bestimmung der spezifischen Bindung erforderlich (4.1.5.).

4.1.5. Supprimierung der spezifischen Bindung

Nach Separierung mit der Agarelektrophorese finden sich auf der anodischen Seite neben den spezifisch gebundenen Liganden auch noch ungeladene, ungebundene und ein kleiner Teil der unspezifisch gebundenen Liganden. Für eine quantitative Bestimmung der spezifischen Bindung wird das spezifisch gebundene ^{3}H-DHT in einem zweiten Ansatz durch nicht radioaktiv markiertes Hormon verdrängt: die spezifische Bindung wird supprimiert. Dabei wird die Tatsache ausgenützt, daß die Konzentration der spezifischen Rezeptorbindungsstellen klein ist (low capacity) im Vergleich zu der Konzentration der unspezifischen Rezeptorbindungsstellen (high capacity). Durch den im supprimierten Ansatz im hundertfachen Überschuß vorhandenen nicht radioaktiv markierten Liganden wird die Bindung des radioaktiv markierten Liganden an den Rezeptor im Vergleich zum nichtsupprimierten Ansatz um mehr als 99% unterdrückt, während die unspezifische Bindung auf Grund ihrer großen Kapazität nicht beeinträchtigt wird. Die anodische Differenz der beiden Ansätze wird supprimierbare Bindung genannt und als die spezifische Bindung des radioaktiven Liganden im nichtsupprimierten Ansatz angesehen.

Als im Überschuß zugegebener nicht radioaktiv markierter Ligand wurde R 1881 verwendet. Würde man unmarkiertes DHT als Ligand im Überschuß zugeben, käme es zu einer ungleichen Beeinflussung der ^{3}H-DHT-Metabolisierung zu ^{3}H-Androstandiolen in den beiden Ansätzen (welche auch durch Zusatz von NAD-ase nicht ganz vermeidbar ist) und damit zu falsch niedrigen Werten für die supprimierbare Bindung. Durch die Supprimierung mit R 1881 bleibt dagegen der DHT-Reststoffwechsel in beiden Ansätzen gleich, und der oben erwähnte Fehler wird vermieden.

4.1.6. Die Korrekturformel

Die Formel von OETTLING (Dissertation Tübingen, in Vorbereitung) dient dazu, einen durch die Supprimierung bedingten systematischen Fehler auszuschalten. Im Ansatz 2 wird das radioaktive Hormon durch das im Überschuß vorhandene nicht markierte Hormon aus der spezifischen Bindung verdrängt, wodurch in diesem Ansatz mehr radioaktives Hormon zur unspezifischen Bindung zur Verfügung steht als im Ansatz 1. Würde man allein die Differenz $\Delta = A_1 - A_2$ zur Berechnung der spezifischen Bindung heranziehen, so würde die Größe der spezifischen Bindung durch dieses Mehr an unspezifischer Bindung in A_2 unterschätzt werden. Ein Teil des in Ansatz 2 frei gewordenen radioaktiven Hormons bindet unspezifisch an Proteine, die bei der Agarelektrophorese zur Kathode wandern, und vergrößert dort den Peak B_2 gegenüber Peak B_1. Der Quotient B_1/B_2 stellt ein ungefähres Maß für das im supprimierten Ansatz mehr für die unspezifische Bindung zur Verfügung stehende radioaktive Hormon dar und dient zur rechnerischen Korrektur des zu hoch gemessenen Peaks A_2.

Zusätzlich soll die Korrekturformel kleinere Fehler beim Pipettieren des radioaktiven Hormons ausgleichen, da diese

sich ebenfalls in der Ausprägung der Peaks B_1 und B_2 wiederspiegeln.

4.1.7. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von SCHAFFNER und WEISSMANN (1973), wobei die Filtration mit Millipore Membranen durch Trocknen der Proteinlösung auf Zelluloseazetatfolie ersetzt wurde (MOELLER 1982).

Bei der herkömmlichen Methode nach LOWRY u.a. (1951) wird die Bestimmung durch größere Mengen an SH-Gruppen gestört, was bei der Verwendung von Amidoschwarz 10 B nicht der Fall ist.

Die mit Rinderserumalbumin erstellt Eichkurve war im Bereich von 0,1 - 6,0 mg Protein/ml linear. Die gemessenen Extinktionswerte lagen zwischen 0,32 (≙ 2 mgProtein/ml) und 0,90 (≙ 5,6 mg Protein/ml) und somit im linearen Bereich der Eichkurve. Die Nachweisgrenze kann als genügend angesehen werden.

4.1.8. DNA-Bestimmung

Die DNA-Bestimmung erfolgte nach der Methode von BURTON (1956). Anstelle von DNA wurde jedoch Desoxyribose als Standard verwandt.

Die Standardkurve war im Bereich von 0,5 - 11,0 µg Desoxyribose/ml linear. Die Extinktionswerte der gemessenen Proben lagen zwischen 0,22 (≙ 2,7 µg Desoxyribose/ml) und 0,66 (≙ 8,3 µg Desoxyribose/ml). Die Nachweisgrenze kann damit als ausreichend angesehen werden.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Prolaktinkonzentration im Serum

In meiner Arbeit führte die Gabe von Sulpirid (25 mg/kg KG) nach zwei Stunden zu einer signifikanten ($p < 0,05$) Erhöhung der Prolaktinkonzentration im Serum.

CLEMENS u.a. (1974) stellten zwei Stunden nach intraperitonealer Injektion von Sulpirid (30 mg/kg KG) einen hochsignifikanten Anstieg der Prolaktinkonzentration fest (159 ng/ml gegenüber 27,5 ng/ml). HOROWSKI und GRÄF (1976) fanden die Prolaktinkonzentration ebenfalls zwei Stunden nach Behandlung mit Sulpirid (25 mg/kg KG) auf das Fünffache gesteigert (150 ng/ml gegeüber 30 ng/ml).

In meiner Arbeit lagen die Prolaktinkonzentrationen nach Stimulation zwar im gleichen Bereich wie bei den zitierten Autoren, jedoch lagen die Konzentrationen bei den Kontrolltieren deutlich über den Normalwerten, die die gleichen Autoren fanden. Deshalb ergab sich in der vorliegenden Arbeit eine vergleichsweise geringe Differenz zwischen den Prolaktinkonzentrationen der 2-Stunden-Sulpiridgruppe und der entsprechenden Kontrollgruppe.

Auch fünf Stunden nach Sulpiridinjektion fand sich eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der Prolaktinkonzentration gegenüber der Kontrollgruppe, deren Werte wiederum ungewöhnlich hoch waren.

Zusammenfassend fand sich sowohl zwei als auch fünf Stunden nach Sulpiridinjektion eine Erhöhung der Prolaktinkonzentration im Serum. Die Erhöhung war jedoch in beiden Fällen, bedingt durch die hohe Prolaktinkonzentration bei den Kontrolltieren, nur gering.

4.2.2. Testosteron im Serum

Die Testosteronkonzentration im Serum änderte sich durch die Behandlung mit Sulpirid nicht. Damit waren die Voraussetzungen für den Versuch erfüllt, eine Korrelation von Prolaktin zum Androgenrezeptor unabhängig von der Testosteronkonzentration im Serum zu untersuchen.

Außerdem fand sich keine Korrelation der Testosteronkonzentration im Serum mit der Androgenrezeptorkonzentration im Cytosol. Hierbei waren sowohl die Konzentrationen des Testosterons im Serum als auch die Konzentrationen des Androgenrezeptors genügend breit gestreut, um eine eventuell bestehende Korrelation sichtbar zu machen. Daher ist es unwahrscheinlich, daß Testosteron bei den 70 Tage alten Tieren an der Rezeptorregulation beteiligt ist.

Hierin stimmen meine Ergebnisse mit denen von MOELLER u.a. (1985) sowie SCHNEIDER (Dissertation Tübingen, in Vorbereitung) überein, die bei 70 Tage alten Tieren ebenfalls keine Korrelation von Rezeptorkonzentration und Testosteron im Serum fanden.

4.2.3. Rezeptorbindungsstellen

Weder zwei noch fünf Stunden nach Sulpiridinjektion fand sich eine signifikante Änderung der Rezeptorkonzentration. Die erhöhte Prolaktinkonzentration im Serum hatte somit keinen Einfluß auf den Androgenrezeptor.

Das Ausbleiben einer Änderung der Rezeptorkonzentration unter den gewählten Versuchsbedingungen ist möglicherweise dadurch zu erklären, daß eine kurzfristige humorale Regulation des Androgenrezeptors nicht möglich ist. Eine Regulierung der Rezeptorkonzentration wäre somit nur dann zu

erwarten, wenn die veränderte Prolaktinkonzentration über einen längeren Zeitraum bestehen bliebe. Gegen diese Annahme und für das Vorhandensein einer kurzfristigen Rezeptorregulation sprechen jedoch die folgenden Befunde:

Die Erhöhung der Prolaktinkonzentration im Serum durch Praemedikation mit Chlorpromazin bei Patienten mit Prostatahypertrophie führt innerhalb weniger Stunden zu einer signifikanten Steigerung der ^{3}H-Testosteronaufnahme in das Prostatahypertrophiegewebe (FARNSWORTH u.a. 1981). Dieser Befund kann so gedeutet werden, daß die Konzentration des Androgenrezeptors ansteigt, obwohl dieser nicht gemessen wurde.

Untersuchungen von STERN (1986) zeigten, daß schnelle Änderungen der Konzentration des Androgenrezeptors im zirkadianen Rhythmus erfolgen. Die Rezeptorkonzentration war zwischen 1.15 Uhr und 7.00 Uhr angestiegen und fiel anschließend bis 9.30 Uhr wieder ab. Unterstellt man, daß die Rezeptorkonzentration auf Änderungen der Prolaktinkonzentration mit einer Stunde Verzögerung reagiert, wäre hierbei eine Regulation durch Prolaktin möglich.

Daß eine kurzfristige Regulation der Rezeptorkonzentration bei meinen Versuchen nicht erfolgte, kann auf der nur geringen Differenz der Prolaktinkonzentration zwischen den Kontroll- und Sulpiridgruppen beruhen, wobei die bereits bei den Kontrolltieren erhöhte Prolaktinkonzentration von besonderer Bedeutung sein könnte. Denn bei bereits bestehenden, hohen Serumkonzentrationen von Prolaktin ist zu erwarten, daß eine weitere Steigerung nur noch geringe Erhöhungen der Rezeptorkonzentration oder sogar deren Abnahme bewirkt. Diese Vermutung legen Befunde von FARNSWORTH (1981) und LLOYD (1973) nahe. So nimmt die Avidität des Prostatahypertrophiegewebes für ^{3}H-DHT beim Menschen mit steigendem Blutspiegel des Prolaktins ab (FARNSWORTH 1981).

Die Aufnahme von ^{3}H-Testosteron in Prostatagewebe erwachsener Ratten ist in vitro unter Zugabe von Schafsprolaktin zum Inkubationsmedium gesteigert, bei hohen Prolaktinkonzentrationen nimmt sie jedoch wieder ab (LLOYD 1973).

Das Ausbleiben einer Änderung der Rezeptorkonzentration in meiner Arbeit könnte allerdings auch bedeuten, daß die Hypothese, Prolaktin steuere den Androgenrezeptor, zumindest für 70 Tage alte Tiere nicht zutrifft. Neuere, bisher unveröffentlichte Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe stützen diese Annahme:

Nach Gabe von Schafsprolaktin bei Ratten, deren eigene Prolaktinsekretion durch Lisurid gedrosselt wurde, fand sich zu bestimmten Tageszeiten keine signifikante Änderung der Rezeptorkonzentration (SCHACHT, Dissertation Tübingen, in Vorbereitung). Ebenso führte die Behandlung hypophysektomierter Tiere mit Schafsprolaktin zu keiner Beeinflussung des Androgenrezeptors (WEIBLEN, Dissertation Tübingen, in Vorbereitung). Ferner kann Prolaktin nicht der Vermittler der früher beobachteten Wirkung von Lisurid auf die Konzentration des Rezeptors sein, da Lisurid auch bei hypophysektomierten Tieren wirkt (HAUG, Dissertation Tübingen, in Vorbereitung).

Noch ungeklärt bleibt die Frage, ob Prolaktin vermittelnder Faktor der Wirkung von Cyproteronazetat ist, das zu einer Steigerung der Rezeptorkonzentration führt. GOERLICH (Dissertation Tübingen, in Vorbereitung) konnte nachweisen, daß die Wirkung von Cyproteronazetat von der Hypophyse abhängt, da es bei hypophysektomierten Tieren keinen Einfluß auf den Androgenrezeptor hat.

Gegen einen Zusammenhang von Prolaktin und Androgenrezeptor spricht in meiner Arbeit, daß sich keine Korrelation der Prolaktinkonzentration im Serum mit der Rezeptorkonzentration im Cytosol fand.

Zusammenfassend scheint eine Beeinflussung der Androgenrezeptorkonzentration durch Prolaktin bei 70 Tage alten Ratten unwahrscheinlich. Zwar kann man bei den zirkadianen Änderungen der Rezeptorkonzentration eine Regulation durch Prolaktin in Betracht ziehen, wenn man eine Stunde Phasenverschiebung voraussetzt, jedoch hatte die durch Sulpirid erhöhte Prolaktinkonzentration ebenso wie die Gabe von Schafsprolaktin keinen Einfluß auf die Rezeptorkonzentration. Weiterhin scheidet Prolaktin als Vermittler der Lisuridwirkung aus. Noch ungeklärt bleibt die Frage nach dem Wirkungsmechanismus von Cyproteronazetat.

4.2.4. Testosteronkonzentration im Pellet

Die Testosteronkonzentration im 100.000 g-Sediment diente in meiner Arbeit als Parameter für die Rezeptorkonzentration im Zellkern, da die direkte Bestimmung des nukleären Androgenrezeptors mit vielen Fehlern behaftet ist.

Rückschlüsse auf die nukleäre Rezeptorkonzentration hätte auch die Bestimmung des DHT-Gehalts im Zellkern zugelassen, weil DHT dort rezeptorgebunden vorliegt und die Rezeptoren weitgehend mit DHT gesättigt sind (BLONDEAU u.a. 1975). Die Bestimmung von DHT im Zellkern wäre jedoch sehr aufwendig gewesen, denn sie hätte eine chromatographische Abtrennung des DHT erfordert.

Auch die Bestimmung der Testosteronkonzentration im Zellkern ermöglicht eine Aussage über die nukleäre Rezeptorkonzentration, da zwischen Testosteron und DHT im Kern eine Proportionalität besteht. MOELLER (1982) gibt das Verhältnis von DHT zu Testosteron bei 70 Tage alten Tieren mit 4,5 : 1 an.

Allerdings war die Testosteronbestimmung nicht in einer

reinen Zellkernfraktion, sondern nur im 100.000 g-Sediment möglich, da bei der Homogenisierung mit dem Mikrodismembrator die Organellen weitgehend zerschlagen werden.

Ferner war der zur Testosteronbestimmung verwandte Antikörper nicht spezifisch für Testosteron. Er wies nach Firmenangaben folgende Kreuzreaktivitäten auf: 5α-DHT 10,3%; 11-Oxotestosteron 2,0%; Androstandiol-(3β) 2,0%; sonstige geprüfte Steroide einschließlich Androstandiol-(3α) unter 0,01%.

In meiner Arbeit fand sich keine signifikante Änderung der Testosteronkonzentration im Pellet. Auch eine Korrelation zwischen den Konzentrationen des Prolaktins im Serum und von Testosteron im Pellet bestand nicht. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß Prolaktin die Translokation des cytoplasmatischen Androgenrezeptors in den Kern nicht beeinflußt. Diese Aussage ist jedoch auf Grund der oben beschriebenen Einschränkungen mit Vorbehalt zu betrachten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ausgehend von der Hypothese, Prolaktin reguliere den Androgenrezeptor in der ventralen Prostata der Ratte, sollte die Wirkung einer akuten Erhöhung der Konzentration des Prolaktins im Serum auf die Rezeptorkonzentration untersucht werden. Zur Erhöhung der Prolaktinkonzentration erhielten die 70 Tage alten männlichen Ratten vom Wistar-Stamm 25 mg/kg KG Sulpirid (Dogmatil^{R}) i.p. injiziert. Zwei bzw. fünf Stunden nach Injektion wurde die Konzentration des cytosolischen Androgenrezeptors und des löslichen Proteins im 100.000 g-Überstand und der DNA im Sediment gemessen. Gleichzeitig wurden die Konzentrationen von Prolaktin und Testosteron im Serum bestimmt. Als Parameter für die nukleäre Rezeptorkonzentration diente die Testosteronkonzentration im 100.000 g-Sediment.

Die Konzentration des Androgenrezeptors wurde gemäß der Methode von WAGNER (1972) in der Modifikation nach MOELLER (1982) ermittelt: Das Gewebe wurde nach Kühlung in flüssigem Stickstoff im Mikrodismembrator homogenisiert und anschließend in dem vierfachen Volumen DST-Puffer suspendiert. Eine Hemmung des DHT-Metabolismus erfolgte durch Zugabe von NAD^{+}-Nucleosidase. Nach Zentrifugation wurde der Rezeptor im 100.000 g-Überstand durch 24-stündige Inkubation bei 0 - 4 °C mit ^{3}H-DHT markiert. In einem Parallelansatz supprimierte man die spezifische Bindung mit R 1881. Der größte Teil des nicht spezifisch gebundenen ^{3}H-DHT wurde mit der Agargelelektrophorese abgetrennt. Die supprimierbare Bindung wurde durch Subtraktion der auf der Anodenseite gemessenen Radioaktivität beider Ansätze ermittelt. Sie entspricht der Bindungskapazität des Androgenrezeptors.

Protein wurde nach der Methode von SCHAFFNER und WEISSMANN (1973) in der Modifikation nach MOELLER u.a. (1983b) be-

stimmt. Die DNA-Bestimmung erfolgte nach der Methode von BURTON (1956), wobei als Standard Desoxyribose verwandt wurde. Die Hormone im Serum und Testosteron im 100.000 g-Sediment wurden radioimmunologisch bestimmt.

Sowohl zwei als auch fünf Stunden nach Injektion von Sulpirid war die Prolaktinkonzentration im Serum signifikant ($p < 0,05$) angestiegen. Die Konzentration des Androgenrezeptors, bezogen auf DNA und lösliches Protein, war dagegen unbeeinflußt geblieben. Ebenfalls unverändert blieben die Konzentrationen des Testosterons im Serum sowie im 100.000 g-Sediment.

Korrelationen der Rezeptorkonzentration mit den Konzentrationen von Prolaktin oder Testosteron im Serum ergaben sich nicht. Ebenso fand sich keine Korrelation der Testosteronkonzentration im Sediment mit der Konzentration des Prolaktins im Serum.

Schluß:

Eine kurzfristige Regulierung des Androgenrezeptors in der ventralen Prostata der 70 Tage alten Ratte durch zirkulierendes Prolaktin ist unwahrscheinlich.

6. ABKÜRZUNGEN

5α-Androstandiol	5α-Androstan-3α,17ß-diol
cpm	counts per minute
DHT	s. Dihydrotestosteron
Dihydrotestosteron	17ß-Hydroxy-5α-androstan-3-on
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	decays per minute
DST	DTT-Sucrose-Tris-Puffer
DTT	DL-Dithiothreitol
FSH	Follitropin
HPL	human prolactin
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
LH	Lutropin
M	mol/l
NAD-ase	NAD^+-Nucleosidase (E.C. 3.2.2.5.)
Pellet	Bodensatz nach dem Zentrifugieren
R 1881	17ß-Hydroxy-17α-methyl-oestra-4,9,11-trien-3-on
rPRL	Rattenprolaktin
SHBG	Sexualhormonbindendes Globulin
Sucrose	Saccharose
Testosteron	17ß-Hydroxy-4-androsten-3-on
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan

7. LITERATURVERZEICHNIS

BLONDEAU, J.P., CORPECHOT, C., GOASCOGNE, C., BAULIEU, E.E., ROBEL, P.: Androgen receptors in the rat ventral prostate and their hormonal control.

Vit. Horm. 33, 319 - 345 (1975)

BOESEL, R.W., KLIPPER, R.W., SHAIN, S.A.: Androgen regulation of androgen receptor content and distribution in the ventral and dorsolateral prostates of aging AXC rats.

Steroids 35, 157 - 177 (1980)

BRUCHOVSKY, N., CRAVEN, S.: Prostatic involution: effect on androgen receptors and intracellular androgen transport.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 62, 837 - 843 (1975)

BURTON, K.: A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of desoxyribonucleic acid.

Biochem. J. 62, 315 - 322 (1956)

CLEMENS, J.A., SMALSTIG, E.B., SAWYER, B.D.: Antipsychotic drugs stimulate prolactin release

Psychopharmacologia (Berl.) 40, 123 - 127 (1974)

DOCUMENTA GEIGY: Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Statistik, 8. Auflage

J.R. Geigy, Pharmazeutische Abteilung Basel (1980)

FARNSWORTH, W.E.: Role of lactogen in prostatic physiology.

Urol. Res. 3, 129 - 132 (1975)

FARNSWORTH, W.E., SLAUNWHITE, W.R.Jr. SHARMA, M., OSEKO, F., BROWN, J.R., GONDER, M.J., CARTAGENA, R.: Interaction of prolactin and testosterone in the human prostate.

Urol. Res. 9, 79 - 88 (1981)

FLÜCKIGER, E.: Regulation der Prolaktin-Sekretion.

Gynäkologe 10, 62 - 65 (1977)

GOERLICH, T.: Dissertation, Tübingen, in Vorbereitung

GRAYHACK, J.T., BUNCE, P.L., KEARNS, J.W., SCOTT, W.W.: Influence of the pituitary on prostatic response to androgen in the rat.

Bull Hopkins Hosp. 96, 154 - 163 (1955)

HAUG, A.: Dissertation, Tübingen, in Vorbereitung

HOROWSKI, R., GRÄF, K.-J.: Influence of dopaminergic agonists and antagonists on serum prolactin concentrations in the rat.

Neuroendocrinology 22, 273 - 286 (1976)

HOSTETTER, M.W., PIACSEK, B.E.: The effect of prolactin deficiency during sexual maturation in the male rat.

Biol. Reprod. 17, 574 - 577 (1977)

JOHNSON, D.C.: Temporal augmentation of LH by prolactin in the stimulation of androgen production by the testes of hypophysectomized male rats.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 145 610 - 613 (1974)

JUNGBLUT, P.W., HUGHES, S., HUGHES, A., WAGNER, R.K.: Evaluation of various methods for the assay of cytoplasmic oestrogen receptors in extracts of calf uteri and human breast cancers.

Acta endocrinol. 70, 185 - 195 (1972)

LANDER, K.: Konzentration des zytoplasmatischen Androgenrezeptors in der Rattenprostata während der Pubertät.

Dissertation, Tübingen (1983)

LLOYD, J.W., THOMAS, J.A., MANWHINNEY, M.G.: A difference in the in vitro accumulation and metabolism of testosterone-1,2-^{3}H by the rat prostate gland following incubation with ovine or bovine prolactin.

Steroids 22, 473 - 477 (1973)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265 - 275 (1951)

MENON, M., TANANIS, C.E., HICKS, E.F., Mc LOUGHLIN, M.G., WALSH, P.C.: Characterization of the binding of a potent synthetic androgen, methyltrienolone, to human tissues. J. Clin. Invest. 61, 150 - 162 (1978)

MOELLER, H.: Bestimmung von Androgenrezeptoren durch Bindung von ^{3}H-Dihydrotestosteron in Gegenwart von NAD^{+}-Nukleosidase. Attempto, Tübingen (1982)

MOELLER, H., KOZ, A., RÖDL, W., FRICK, H.-J., GUPTA, D.: Role of the pineal gland in the regulation of prostatic androgen receptors in pubertal and mature rats. Res. Exp. Med. 183, 157 - 165 (1983 a)

MOELLER, H., OETTLING, G., FIEDERER, B., BRÜGMANN, G.: A quantitative assay for the cytoplasmic androgen receptor using ^{3}H-dihydrotestosterone in the presence of NAD^{+}-nucleosidase. Acta endocrinol. 102, 153 - 160 (1983 b)

MOELLER, H., SCHNEIDER, C., GOECKE, B.: Prolactin: Ein Regulator des zytoplasmatischen Androgen-Rezeptors in der Prostata? in: Harzmann, R., Jacobi, G.H., Weissbach, L. (eds.): Experimentelle Urologie. Springer, Berlin, Heidelberg (1985)

MOGER, W., GESCHWIND, J.J.: The action of prolactin on the sex accessory glands of the male rat. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 142, 1017 - 1021 (1972)

MURPHY, B.E.P.: Binding of testosterone and estradiol in plasma. Can. J. Biochem. 46, 299 - 302 (1968)

OETTLING, G.: Dissertation, Tübingen, in Vorbereitung

RENOIR, J.-M., MERCIER-BODARD, C., BAULIEU, E.-E.: Hormonal and immunological aspects of the phylogeny of sex steroid binding plasma protein.

Acad. Sci. U.S.A. 77, 4578 - 4583 (1980)

SANDBERG, A.A., SLAUNWHITE, W.R., ANTONAIDES, H.N.: The binding of steroids and steroid conjugates to human plasma proteins.

Recent Prog. Horm. Res. 13, 209 - 267 (1967)

SCHACHT, K.: Dissertation, Tübingen, in Vorbereitung

SCHAFFNER, W., WEISSMANN, C.: A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution.

Anal. Biochem. 56, 502 - 514 (1973)

SCHNEIDER, C.: Dissertation, Tübingen, in Vorbereitung

SEGALOFF, A., STEELMAN, S.L., FOLRES, A.: Prolactin as a factor in the ventral prostate assay for luteinizing hormone.

Endocrinology 59, 233 - 240 (1956)

SNOCHOWSKI, M., POUSETTE, Å., EKMAN, P., BRESSION, D., ANDERSON, L., HÖGBERG, B., GUSTAFSSON, J.-Å.: Characterization and measurement of androgen receptor in human benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma.

J. Clin. Endocrinol. Metab. 45, 920 - 930 (1977)

STERN, W.D.: Circadiane Änderungen der Konzentration des cytosolischen Androgenrezeptors der Rattenprostata in Abhängigkeit von der Konzentration des Prolaktins im Serum.

Dissertation, Tübingen (1986)

STÜTZLE, H.: Periphere Hormone und ihre Beziehung zum Wachstum bei der männlichen Ratte.

Dissertation, Tübingen (1983)

SULLIVAN, J.N., STROTT, C.A.: Evidence for an androgen-independent mechanism regulating the levels of receptor in target tissue.

J. Biol. Chem. 248, 3202 - 3208 (1973)

WAGNER, R.K.: Characterization and assay of steroid hormone receptors and steroid-binding serum proteins by agar gel electrophoreses at low temperature.

Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 253, 1235 - 1245 (1972)

WAGNER, R.K.: Extracellular and intracellular steroid binding proteins. Properties, discrimination, assay and clinical application.

Acta Endocrinol. Suppl. 218, 5 - 73 (1978)

WAGNER, R.K., JUNGBLUT, P.W.: Oestradiol- and dihydrotestosterone receptors in normal and neoplastic human mammary tissue.

Acta endocrinol. 82, 105 - 120 (1976)

WEIBLEN, E.: Dissertation, Tübingen, in Vorbereitung

WELLHÖNER, H.-H.: Allgemeine und systematische Pharmakologie und Toxikologie.

Springer, Berlin, Heidelberg, New York 3. Auflage (1982)

Herrn Professor Dr. D. Gupta, Direktor der Abteilung für Laboratoriumsdiagnostik von Stoffwechsel- und Hormonkrankheiten an der Universitätskinderklinik Tübingen (Ärztlicher Direktor Professor Dr. J. R. Bierich) danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. med. Dipl. Biochem. H. Moeller für die Überlassung des Themas und für seine eingehende Betreuung während des Entstehens dieser Arbeit.

Herrn P. Kuhlmann, Dr. S. Hasan und Dr. R. Horowski von der Firma Schering AG (Berlin) danke ich für die Bestimmung der rPRL-Werte.

Für die während des experimentellen Abschnitts der Arbeit gewährte Unterstützung möchte ich Frau Barbara Goecke (MTA) meinen Dank aussprechen.

LEBENSLAUF

Am 1. Dezember 1958 wurde ich, Ulrich Steinbach, als Sohn des Friseurmeisters Walter Steinbach und seiner Ehefrau Lore Steinbach, geborene Neuhäußer, in Ludwigsburg geboren.

Von 1965 bis 1968 besuchte ich die Grundschule in Ludwigsburg-Oßweil, von 1968 bis 1977 das Mörike-Gymnasium Ludwigsburg, wo ich im Mai 1977 die Reifeprüfung ablegte.

In der Zeit von Januar 1978 bis April 1979 leistete ich an den Krankenanstalten des Landkreises Ludwigsburg meinen Zivildienst ab.

Im April 1979 begann ich das Medizinstudium an der Universität Tübingen und bestand dort im März 1981 das Physikum, im März 1982 den ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und im August 1984 den zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

Das Praktische Jahr absolvierte ich am Centre Médico-Chirurgical Arès und am Centre Hospitalier Bayonne, beides akademische Lehrkrankenhäuser der Universität Bordeaux.

In Tübingen bestand ich am 30. Oktober 1985 den schriftlichen und am 15. November 1985 den mündlichen Teil des dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung.

Die Approbation erhielt ich am 3. Januar 1986.